

A4 JPO

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-507499
(P2004-507499A)

(43) 公表日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(51) Int.C1.⁷

A61K 31/352
A61K 31/7048
A61P 19/10
// C07D 311/30
C07H 17/07

F I

A 61 K 31/352
A 61 K 31/7048
A 61 P 19/10
C 07 D 311/30
C 07 H 17/07

テーマコード(参考)

4C057
4C062
4C086

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 63 頁)

(21) 出願番号 特願2002-522883 (P2002-522883)
(86) (22) 出願日 平成13年3月9日 (2001.3.9)
(85) 翻訳文提出日 平成14年3月11日 (2002.3.11)
(86) 國際出願番号 PCT/KR2001/000368
(87) 國際公開番号 WO2002/017909
(87) 國際公開日 平成14年3月7日 (2002.3.7)
(31) 優先権主張番号 2000/46916
(32) 優先日 平成12年8月14日 (2000.8.14)
(33) 優先権主張國 韓国 (KR)

(71) 出願人 502132106
コリア インスティチュート オブ オリ
エンタル メデシン
大韓民国 135-765 ソウル カン
グナムグ チェオングダムドング 129
- 11 セシンビル4階
(74) 代理人 100087826
弁理士 八木 秀人
(74) 代理人 100110526
弁理士 清水 修
(72) 発明者 金 貞淑
大韓民国 ソウル特別市 江南区 清潭洞
129-11 青岩ビル4階

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】クエルセチン誘導体を有効成分として含有する骨粗鬆症治療剤

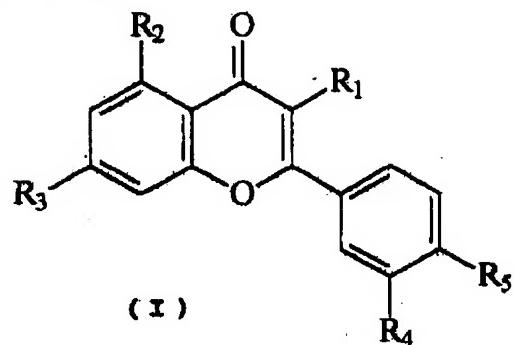
(57) 【要約】

本発明は骨芽細胞 (osteoblast) の細胞増殖促進効果及び破骨細胞 (osteoclast) の細胞増殖抑制効果に優れた、下記一般式 (I) で表されるクエルセチン誘導体を有効成分として含有する骨粗鬆症治療剤に関する。本発明のクエルセチン誘導体は、従来の骨粗鬆症治療剤に比べて骨芽細胞の細胞増殖促進効果及び破骨細胞の細胞増殖抑制効果に優れ、体内ホルモンの変化を大きく誘発せず、海綿骨の面積増加効果がさらに高く現れるのみならず、副作用がなく造血機能や免疫系に影響を与えない安全な薬物として確認され、骨粗鬆症治療剤または予防剤として幅広く活用されうる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記一般式(I)で表されるクエルセチン誘導体を有効成分として含有し、薬学的に許容される担体を含む骨粗鬆症治療剤：



10

式中、

R₁はゲンチオトリオース(gentiotriose)、グルコピラノース(glucopyranose)、O-アラビノフランノース(O-arabinofuranose)、O-ジグルコピラノース(O-diglucopyranose)、O-ガラクトピラノース(O-galactopyranose)、O-ガラクトシドガレート(O-galactoside-gallate)、O-ゲンチオビオース(O-gentiobiose)、O-グルコピラノース(O-glucopyranose)、O-グルクロニド(O-glucuronide)、O-ネオヘスペリドス(O-neohesperidose)、O-ラムノピラノース(O-rhamnopyranose)、O-ルチノース(O-rutinose)、O-ソフォロース(O-sophorose)、O-キシロピラノース(O-xylopyranose)、OCH₃、OH、ラムノゲンチオビオース(rhamnogentiobiose)、ラムノグルコース(rhamnoglucose)または硫黄(sulfate)であり；R₂はOHまたはO-グルコピラノース(O-glucopyranose)であり；R₃はOCH₃、OH、O-グルコピラノース(O-glucopyranose)、O-グルクロノピラノース(O-glucuronopyranose)またはグルコピラノース(glucopyranose)であり；

20

R₄はOCH₃またはOHであり；及び

30

R₅はOCH₃、OH、O-グルコピラノース(O-glucopyranose)またはO-グルコース(O-glucose)である。

【請求項 2】

クエルセチンの誘導体は、前記一般式(I)において、R₂ないしR₅が-OHであるクエルセチン(quercetin)、アビキュラロシド(avicularoside)、キアザベリン(guiacavérin)、ハイパーロシド(hyperoside)、イソハイパーロシド(isohyperoside)、イソクエルシトリン(isoquercitrin)、マルチノシドA(multinoside A)、マルチノシドAアセテート(multinoside A acetate)、クエルシトリン(quercitrin)、ルチン(rutin)、クエルセチン-3-O-(2'-O-β-D-グルコピラノシリル)-α-L-ラムノピラノシド(quercetin-3-O-(2'-O-β-D-glucopyranosyl)-α-L-rhamnopyranoside)、クエルセチン-3-O-(6'-O-ガロイル)-グルコピラノシド(quercetin-3-O-(6'-O-galloyl)-glucopyranoside)、クエルセチン-3-O-(6''-O-クマロイル-β-D-グルコピラノシリル-(1-2)-α-L-ラムノピラノシド)(quercetin-3-O-(6''-O-p-coumaroyl-β-D-glucopyranosyl-(1-2)

40

50

) - α -L-rhamnopyranoside))、クエルセチン-3-O-D-グルコピラノシル-(1-6)- β -D-グルコピラノシル-(1-4)- α -L-ラムノピラノシド(quercetin-3-O-D-glucopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranoside)、クエルセチン-3-O-[2"-O-6'"]-O-p-(7"")-O- β -D-グルコピラノシル]クマロイル- β -D-グルコピラノシル]- α -L-ラムノピラノシド(quercetin-3-O-[2"-O-6'"]-O-p-(7"")-O- β -D-glucopyranosyl) coumaroyl- β -D-glucopyranosyl]- α -L-rhamnopyranoside)、クエルセチン-3-O-[6'"]-p-クマロイル- β -D-グルコピラノシル- β -(1-4)-ラムノピラノシド](quercetin-3-O-[6'"]-p-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl- β -(1-4)-rhamnopyranoside])、クエルセチン-3-O-[α -L-ラムノピラノシド(1-2)- α -L-ラムノピラノシド-(1-6)- β -D-グルコピラノシド](quercetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranoside])、クエルセチン-3-O-[α -ラムノピラノシド(1-4) α -L-ラムノピラノシド(1-6) β -D-ガラクトピラノシド](quercetin-3-O-[α -rhamnopyranosyl-(1-4) α -L-rhamnopyranosyl-(1-6) β -D-galactopyranoside])、クエルセチン-3-O-[α -ラムノピラノシド-(1-2)]- β -D-グルコピラノシル-(1-6)]- β -D-ガラクトピラノシド(quercetin-3-O-[α -rhamnopyranosyl-(1-2)]- β -glucopyranosyl-(1-6)]- β -D-galactopyranoside)、クエルセチン-3-O-[α -ラムノピラノシド-(1-4)- α -ラムノピラノシド-(1-6)- β -ガラクトピラノシド](quercetin-3-O-[α -rhamnopyranosyl-(1-4)- α -rhamnopyranosyl-(1-6)- β -galactopyranoside])、クエルセチン-3-O- α -L-ラムノピラノシド-(1-2)- β -D-ガラクトピラノシド(quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-galactopyranoside)、クエルセチン-3-O- β -D-ジグルコピラノシド(quercetin-3-O- β -D-diglucopyranoside)、クエルセチン-3-O- β -D-ガラクトシド-2"-ガレート(quercetin-3-O- β -D-galactoside-2"-galate)、クエルセチン-3-O- β -D-グルコピラノシド-(1-6)- β -D-ガラクトピラノシド(quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside-(1-6)- β -D-galactopyranoside)、クエルセチン-3-O- β -D-グルコピラノシル-(1-3)- α -L-ラムノピラノシド-(1-6)- β -D-ガラクトピラノシド(quercetin-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1-3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-galactopyranoside)、クエルセチン-3-O- β -D-グルクロナイド(quercetin-3-O- β -D-glucuronide)、クエルセチン-3-O- β -D-キシロピラノシド(quercetin-3-O- β -D-xylopyranoside)、クエルセチン-3-O-ジグルコピラノシド(quercetin-3-O-diglucospyranoside)、クエルセチン-3-O-ゲンチオビオシド(quercetin-3-O-gentiobioside)、クエルセチン-3-O-グルコピラノシルガラクトピラノシド(quercetin-3-O-glucopyranosylgalactopyranoside)、クエルセチン-3-O-ネオヘスペリドシド(quercetin-3-O-neohesperidoside)、クエルセチン-3-O-ゲンチオトリオシド(quercetin-3-O-gentiotriose)、クエルセチン-3-メチルエーテル(quercetin-3-methylether) 10
20
30
40
50

l ether)、クエルセチン-3-ラムノゲンチオビオシド(querce tin-3-rhamnogent iobioside)、クエルセチン-3-ラムノグルコシド(querce tin-3-rhamnoglucoside)またはクエルセチン-3-硫酸塩(querce tin-3-sulfate)であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項3】

クエルセチンの誘導体は、前記一般式(I)において、R₁が-OHであり、R₂ないしR₅のうち三つの機能グループがOHである、イソラムネチン(isorhamnetin)、クエルシメリトリン(quer cimeritrin)、ラムネチン(rhamnetin)、クエルセチン-5-O-β-D-グルコピラノシド(querce tin-5-O-β-D-glucopyranoside)、クエルセチン-7-O-β-D-グルクロノピラノシド(querce tin-7-O-β-D-glucuronopyranoside)またはスピレオシド(spiraea oside)であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項4】

クエルセチンの誘導体は、前記一般式(I)において、R₁ないしR₅のうち三つの機能グループがOHである、ラムナジン(rhamnazin)、クエルセチン-3'、4'-ジメチルエーテル(querce tin-3'、4'-dimethyl ether)、クエルセチン-3、3'-ジメチルエーテル(querce tin-3、3'-dimethyl ether)、クエルセチン-3、7-ジメチルエーテル(querce tin-3、7-dimethyl ether)、クエルセチン-3-O-[2"-O-(6'”-O-p-クマロイル)-β-D-グルコピラノシリ]-α-L-ラムノピラノシド-7-O-β-D-グルコピラノシド(querce tin-3-O-[2"-O-(6'”-O-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranosyl]-α-L-rhamnopyranoside)、クエルセチン-3-O-[2"-O-6'”-O-p-(7'”-O-β-D-グルコピラノシリ)クマロイル-β-D-グルコピラノシリ]-α-L-ラムノピラノシド-7-O-β-D-グルコピラノシド(querce tin-3-O-[2"-O-6'”-O-p-(7'”-O-β-D-glucopyranosyl)coumaroyl-β-D-glucopyranosyl]-α-L-rhamnopyranoside)、クエルセチン-3-O-ルチノシド-7-O-β-D-グルコピラノシド(querce tin-3-O-rutinoside)、クエルセチン-3-O-アラビノピラノシリ-7-O-β-D-グルコピラノシド(querce tin-3-O-α-L-arabinopyranosyl-7-O-β-D-glucopyranoside)、クエルセチン-3-O-β-D-グルコピラノシド-3-O-ソフォロシド(querce tin-3-O-β-D-glucopyranoside-3-O-sophoroside)、クエルセチン-3-O-ガラクトピラノシリ-7-O-ジグルコピラノシド(querce tin-3-O-galactopyranosyl-7-O-diglucopyranoside)、クエルセチン-3-O-グルコピラノシリ-7-O-ジグルコピラノシ(querce tin-3-O-glucopyranosyl-7-O-diglucopyranoside)、クエルセチン-3、7-ジグルコピラノシド(querce tin-3、7-diglucopyranoside)、クエルセチン-3-ゲンチオビオシリ-7-グルコピラノシド(querce tin-3-gent iobiosyl-7-glucopyranoside)またはクエルセチン-3、4'-ジ-O-β-D-グルコピラノシド(querce tin-3、4'-di-O-β-D-glucopyranoside)であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項5】

クエルセチンの誘導体は、クエルセチン-3、4'、7-トリメチルエーテル(quer-

10

20

30

40

50

cetin-3、4'、7-trimethyl ether) またはクエルセチン-3、3'、4'、7-テトラメチルエーテル (quercetin-3、3'、4'、7-tetramethyl ether) であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項6】

薬学的に許容される担体は、ポリビニールピロリドン及びヒドロキシプロピルセルロースで構成されたグループから選ばれる1種の結合剤であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項7】

薬学的に許容される担体は、カルボキシメチルセルロースカルシウム及び澱粉グリコール酸ナトリウムよりなるグループから選ばれる1種の滑沢剤であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。 10

【請求項8】

薬学的に許容される担体は、トウモロコシ澱粉、乳糖、大豆油、結晶セルロース及びマンニトールで構成されたグループから選ばれる1種の稀釀剤であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項9】

薬学的に許容される担体は、ステアリン酸マグネシウム及びタルクよりなるグループから選ばれる1種の滑沢剤であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項10】

薬学的に許容される担体は白糖、果糖、ソルビトール及びアスパータムよりなるグループから選ばれる1種の甘味剤であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。 20

【請求項11】

薬学的に許容される担体はカルボキシメチルセルロースナトリウム、 α または β シクロデキストリン、ビタミンC、クエン酸及び白礹より構成されたグループから選ばれる1種の安定剤であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項12】

薬学的に許容される担体はパラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸プロピル及び安息香酸ナトリウムで構成されたグループから選ばれる1種の保存料であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。 30

【請求項13】

薬学的に許容される担体はエチルバニリン、マスキングフラボール、メントルフラボノ及びハーブ香で構成されたグループから選ばれる1種の香料であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

【請求項14】

治療剤は錠剤、カプセル剤、軟質カプセル剤、液剤、軟膏剤、丸剤、散剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、坐剤及び注射剤とから構成されたグループから選ばれる1種の経口投与製剤、または非経口投与製剤であることを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。

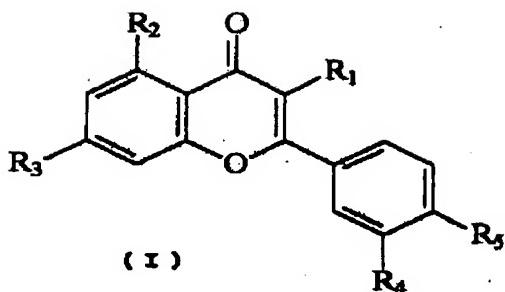
【請求項15】

カルシウムまたはビタミンD₃をさらに含むことを特徴とする請求項1に記載の骨粗鬆症治療剤。 40

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明はクエルセチン (quercetin) 誘導体を有効成分として含有する骨粗鬆症治療剤に係り、さらに具体的に骨芽細胞 (osteoblast) の細胞増殖促進効果及び破骨細胞 (osteoclast) の細胞増殖抑制効果に優れた、下記一般式 (I) で表されるクエルセチン誘導体を有効成分として含有する骨粗鬆症治療剤に関する。



背景技術

骨粗鬆症 (osteoporosis) は骨組織の脱灰により骨の緻密質が薄くなり、よって骨髄腔が広まる疾患であって、病勢が進むことにより骨が弱まるため、軽い衝撃にも骨折しやすくなる。骨量は遺伝的要因、栄養摂取、ホルモンの変化、運動及び生活習慣の違いなど色々の要因により影響を受ける。老齢、運動不足、低体重、喫煙、低カルシウム食餌、閉経、卵巣摘出などにより骨粗鬆症が誘発されると知られている。特に、女性の場合 30 歳以降から骨減少が持続的に進み、閉経期に至るとエストロゼン (estrogen) 濃度が急激に減少して IL-7 (interleukin-7) により B リンパ球が生成されるものと類似に B-リンパ球 (B-lymphocyte) が多量生成されることにより骨髓 (bone marrow) に B 細胞の前駆体 (pre-B cell) が蓄積され、よって IL-6 の量が増えて破骨細胞の活性を増加させるため、結局骨量が減るようになる。このような骨粗鬆症は程度に差があるが、老年層、特に閉経期以後の女性にとっては症候は多様だが、避けられない症状なので、人口の高齢化に伴う骨粗鬆症を予防及び治療するために全世界的に各研究機関と製薬会社では骨疾患治療剤の開発に多くの投資がなされている。

現在骨粗鬆症治療剤として使用されている物質としては、エストロゼン (estrogen)、アンドロゲンアナボリックステロイド (androgenic anabolic steroid)、カルシウム製剤、磷酸塩、弗素製剤、イプリフラボン (ipriflavone)、ビタミン D₃ などがある。かつ、最近は 1995 年アメリカのマーク社 (Merck Co.) でアミノビスフォスフォネート (aminobisphosphonate) を、1997 年アメリカの Eli Lilly Co. で選択的なエストロゼン受容体調節器 (selective estrogen receptor modulator, SERM) として働くラロキシフェン (raloxifene) を骨粗鬆症に対する新薬として開発したことがある。

前述した骨粗鬆症治療剤はほぼ癌、胆石、血栓症などの副作用が現れるエストロゼン系の物質であることだと知られている。しかし、骨粗鬆症は薬物の長期投与が必須なので、薬物を長期投与する時にはエストロゼンを代替できるほど優れた薬効を有する新たな物質の開発が要求されている。

エストロゼン代替物質として大豆のイソフラボン (soybean isoflavone) のような植物エストロゼン (phytoestrogen) が報告されている。植物エストロゼンは 1946 年に最初に報告されたが、「クローバ病 (clover disease)」[赤いクローバ種 (red clover, Trifolium subterraneum var. Dwalganup) に属する植物を食べた羊の不妊率が 30 % 以上増加され、「クローバ病」と命名される] の原因がこの植物に含有された成分のうちエストロゼンに似ているイソフラボノイド (isoflavonoid) であることを明かし、植物から得られたこのような化合物を「植物エストロゼン」と命名した。その後、ダイゼイン (daidzein)、ゲニステイン (genistein)、フォルムオノネチン (formononetin)、ビオカニン A (biochanin A) などのイソフラボン (isoflavone) 類化合物、クメストロール (coumestrol) などのクメスタン (coumestan) 類化合物、エンテロラクトン (enterolactone) などのリグナン (lignan) 系化合物及びエンテロジオール (entelodiol) など

10

20

30

40

50

enterodiol)などのフェノール(phenol)系化合物などが植物エストロゼンとして報告された。これら植物エストロゼンはほぼアグリコン(aglycone)、6'-O-アセチルグルコシド(6'-O-acetylglucoside)または、6'-O-マロニルグルコシド(6'-O-malonylglucoside)などの形態に在し、ダイゼインとゲニステインは7-O-グルコシド(7-O-glucoside)の形態に存する。

前記化合物のうち糖化合物は腸内バクテリアの β -グルコシダーゼ(β -glucosidase)または胃酸により加水分解され、結局フリー(free)イソフラボンであるアグリコンの形態に吸収されることと知られている。今までの研究結果によれば、前記植物エストロゼンは動物のエストロゼンと類似した作用を示すことと知られている。すなわち、エストロゼン受容体に結合して乳癌細胞の成長を抑え閉経期以後に現れる心血管系疾患(cardiovascular disease)及びその他の症状の治療にエストロゼンを代替して使用されることが報告された。しかし、前記植物エストロゼンによる骨粗鬆症予防及び治療効果が微弱であり、天然物から分離精製時高コストになり、骨粗鬆症予防及び治療に幅広く活用できない現状である。

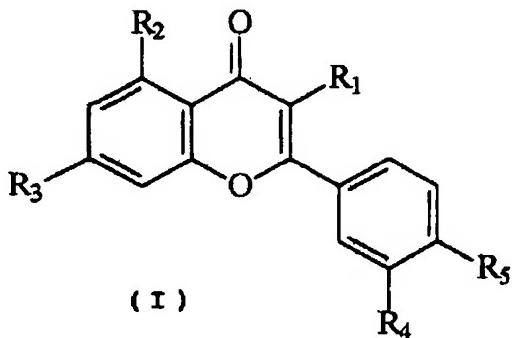
従って、副作用がなく、骨粗鬆症予防及び治療効果がよく、低コストの代替物質を開発すべき必要性が絶え間なく台頭された。

発明の開示

これに本発明者らは副作用がなく、骨粗鬆症予防及び治療効果が良く、生産コストが低廉な代替物質を開発するために鋭意工夫した結果、化学的に合成可能なクエルセチン誘導体が骨芽細胞の細胞増殖を促進し破骨細胞の細胞増殖を抑える活性が優秀でのみならず、体内の臓器組織に副作用を示さなくて安全性を有するところ、クエルセチン誘導体を骨粗鬆症治療剤の有効成分として使用できることを確認し、本発明を完成するに至った。

つまり、本発明の目的はクエルセチン(quercetin)及びその誘導体を有効成分として含有する骨粗鬆症治療剤を提供するところにある。

本発明は下記一般式(I)で表されるクエルセチン誘導体を有効成分として含有し、薬学的に許容される担体を含む骨粗鬆症治療剤を提供する:



式中、

R₁はゲンチオトリオース(gentiotriose)、グルコピラノース(glucopyranose)、O-アラビノフランノース(O-arabinofuranose)、O-ジグルコピラノース(O-diglucopyranose)、O-ガラクトピラノース(O-galactopyranose)、O-ガラクトシドガレート(O-galactoside-gallate)、O-ゲンチオビオース(O-gentioibiose)、O-グルコピラノース(O-glucopyranose)、O-グルクロニド(O-glucuronide)、O-ネオヘスペリドス(O-neohesperidose)、O-ラムノピラノース(O-rhamnopyranose)、O-ルチノース(O-rutinose)、O-ソフォロース(O-sophorose)、O-キシロピラノース(O-xylopyranose)、OCH₃、OH、ラムノゲンチオビオース(rhamnogentiobiose)、ラムノグルコース(rhamno-

10

20

30

40

50

glucose) または硫酸 (sulfate) であり；

R_2 は OH または O-グルコピラノース ($O\text{-glucopyranose}$) であり；

R_3 は OCH_3 、OH、O-グルコピラノース ($O\text{-glucopyranose}$)、O-グルクロピラノース ($O\text{-glucuronopyranose}$) またはグルコピラノース ($glucopyranose$) であり；

R_4 は OCH_3 または OH であり；及び、

R_5 は OCH_3 、OH、O-グルコピラノース ($O\text{-glucopyranose}$) または O-グルコース ($O\text{-glucose}$) である。

前記一般式 (I) のクエルセチン誘導体のうち一般によく知られている化合物は次のように分類できる：(i) R_2 ないし R_5 が $-OH$ であり、 R_1 により相違になる誘導体グループであって、 R_1 が OH であるクエルセチン (quercetin)、 R_1 が $O-\alpha-L\text{-アラビノフランノース}$ ($\alpha\text{-arabinofuranose}$) であるアビキュラロシド (avicularoside)、 R_1 が $O\text{-アラビノピラノース}$ ($O\text{-arabinopyranose}$) であるキアザベリン (guiajaverin)、 R_1 が $O-\beta-D\text{-ガラクトピラノース}$ ($O-\beta-D\text{-galactopyranose}$) であるハイパーロシド (hyperoside)、 R_1 が $O-\beta-D\text{-ガラクトピラノース}$ ($O-\beta-D\text{-galactopyranose}$) であるイソハイパーロシド (isohyperoside)、 R_1 が $O\text{-グルコピラノース}$ ($O\text{-glucopyranose}$) であるイソクエルシトリン (isoquercitrin)、 R_1 が $O-[\beta-D\text{-グルコピラノシリル-(1-4)-\alpha-L\text{-ラムノピラノース}]$ ($O-[\beta-D\text{-glucopyranosyl-(1-4)-\alpha-L\text{-rhamnopyranose}]$) であるマルチノシド A (multinoside A)、 R_1 が $(6-O\text{-アセチル})-\beta-D\text{-グルコピラノシリル-(1-4)-\alpha-L\text{-ラムノピラノース}$ ($(6-O\text{-acetyl})-\beta-D\text{-glucopyranosyl-(1-4)-\alpha-L\text{-rhamnopyranose}$) であるマルチノシド A アセテート (multinoside A acetate)、 R_1 が $O-\alpha-L\text{-ラムノピラノース}$ ($O-\alpha-L\text{-rhamnopyranose}$) であるクエルシトリン (quercitrin)、 R_1 が $O-\beta-D\text{-ルチノース}$ ($O-\beta-D\text{-rutinose}$) であるルチン (rutin)、 R_1 が $O-(2''-O-\beta-D\text{-グルコピラノシリル)-\alpha-L\text{-ラムノピラノース}$ ($O-(2''-O-\beta-D\text{-glucopyranosyl)-\alpha-L\text{-rhamnopyranose}$) であるクエルセチン-3- $O-(2''-O-\beta-D\text{-グルコピラノシリル)-\alpha-L\text{-ラムノピラノシリド}$ (quercetin-3- $O-(2''-O-\beta-D\text{-glucopyranosyl)-\alpha-L\text{-rhamnopyranoside}$)、 R_1 が $O-(6''-O\text{-ガロイル})\text{-グルコピラノース}$ ($O-(6''-O\text{-galloyl})\text{-glucopyranose}$) であるクエルセチン-3- $O-(6''-O\text{-ガロイル})\text{-グルコピラノシリド}$ (quercetin-3- $O-(6''-O\text{-galloyl})\text{-glucopyranoside}$)、 R_1 が $O-(6''-O\text{-p-クマロイル})\text{-\beta-D\text{-グルコピラノシリル-(1-2)-\alpha-L\text{-ラムノピラノース}}$ ($O-(6''-O\text{-p-coumaroyl})\text{-\beta-D\text{-glucopyranosyl-(1-2)-\alpha-L\text{-rhamnopyranose}}$) であるクエルセチン-3- $O-(6''-O\text{-p-クマロイル})\text{-\beta-D\text{-グルコピラノシリド}$ (quercetin-3- $O-(6''-O\text{-p-coumaroyl})\text{-\beta-D\text{-glucopyranoside}}$)、 R_1 が $O-D\text{-グルコピラノシリル-(1-6)-\beta-D\text{-グルコピラノシリル-(1-4)-\alpha-L\text{-ラムノピラノース}}$ ($O-D\text{-glucopyranosyl-(1-6)-\beta-D\text{-glucopyranosyl-(1-4)-\alpha-L\text{-rhamnopyranose}}$) であるクエルセチン-3- $O-D\text{-グルコピラノシリル-(1-6)-\beta-D\text{-グルコピラノシリル-(1-4)-\alpha-L\text{-ラムノピラノシリド}}$ (quercetin-3- $O-D\text{-glucopyranosyl-(1-6)-\beta-D\text{-glucopyranosyl-(1-4)-\alpha-L\text{-rhamnopyranoside}}$)、 R_1 が $O-[2''-O-6'''-O\text{-p-(7'''-O-\beta-D\text{-グルコピラノシリル)}}]$ ($O-[2''-O-6'''-O\text{-p-(7'''-O-\beta-D\text{-glucopyranosyl})}]$) である。

10

20

30

40

50

ノシル) クマロイル- β -D-グルコピラノシル] - α -L-ラムノピラノース (0-[2"-0-6' "-0-p-(7" "-0- β -D-glucoopyranosyl) coumaroyl- β -D-glucoopyranosyl] - α -L-rhamnopyranose) であるクエルセチン-3-0-[2"-0-6' "-0-p-(7" "-0- β -D-グルコピラノシル) クマロイル- β -D-グルコピラノシル] - α -L-ラムノピラノシド (quercetin-3-0-[2"-0-6' "-0-p-(7" "-0- β -D-glucoopyranosyl) coumaroyl- β -D-glucoopyranosyl] - α -L-rhamnopyranoside)、R₁ が 0-[6' "-p-クマロイル- β -D-グルコピラノシル- β -(1-4)-ラムノピラノース] (0-[6' "-p-coumaroyl- β -D-glucoopyranosyl- β -(1-4)-rhamnopyranose]) であるクエルセチン-3-0-[6' "-p-クマロイル- β -D-グルコピラノシル- β -(1-4)-ラムノピラノシド] (quercetin-3-0-[6' "-p-coumaroyl- β -D-glucoopyranosyl- β -(1-4)-rhamnopyranoside])、R₁ が 0-[α -L-ラムノピラノシド(1-2)- α -L-ラムノピラノシド-(1-6)- β -D-グルコピラノース] (0-[α -L-rhamnopyranosyl(1-2)- β -D-glucoopyranose]) であるクエルセチン-3-0-[α -L-ラムノピラノシド(1-2)- α -L-ラムノピラノシド-(1-6)- β -D-グルコピラノシド] (quercetin-3-0-[α -L-rhamnopyranosyl(1-2)- α -L-rhamnopyranoside])、R₁ が 0-[α -ラムノピラノシド(1-4) α -L-ラムノピラノシド(1-6) β -D-ガラクトピラノース] (0-[α -rhamnopyranosyl(1-6) β -D-galactopyranose]) であるクエルセチン-3-0-[α -ラムノピラノシド(1-4) α -L-ラムノピラノシド(1-6) β -D-ガラクトピラノシド] (quercetin-3-0-[α -rhamnopyranosyl(1-4) α -L-rhamnopyranosyl(1-6) β -D-galactopyranoside])、R₁ が 0-[α -ラムノピラノシド-(1-2)] - [β -グルコピラノシル-(1-6)] - β -D-ガラクトピラノース (0-[α -rhamnopyranosyl(1-2)] - [β -glucoopyranosyl(1-6)] - β -D-galactopyranose) であるクエルセチン-3-0-[α -ラムノピラノシド-(1-2)] - [β -グルコピラノシル-(1-6)] - β -D-ガラクトピラノシド (quercetin-3-0-[α -rhamnopyranosyl(1-2)] - [β -glucoopyranosyl(1-6)] - β -D-galactopyranoside)、R₁ が 0-[α -ラムノピラノシド-(1-4)- α -ラムノピラノシド-(1-6)- β -ガラクトピラノース] (0-[α -rhamnopyranosyl(1-4)- α -rhamnopyranosyl(1-6)- β -galactopyranose]) であるクエルセチン-3-0-[α -ラムノピラノシド-(1-4)- α -ラムノピラノシド-(1-6)- β -ガラクトピラノシド] (quercetin-3-0-[α -rhamnopyranosyl(1-4)- α -rhamnopyranosyl(1-6)- β -galactopyranoside])、R₁ が 0-[α -ラムノピラノシド-(1-4)- α -ラムノピラノシド-(1-6)- α -ガラクトピラノース] (0-[α -rhamnopyranosyl(1-4)- α -rhamnopyranosyl(1-6)- α -galactopyranose]) であるクエルセチン-3-0-[α -ラムノピラノシド-(1-4)- α -ラムノピラノシド-(1-6)- β -ガラクトピラノシド] (quercetin-3-0-[α -rhamnopyranosyl(1-4)- α -rhamnopyranosyl(1-6)- β -galactopyranoside])、R₁ が 0-[α -ラムノピラノシド-(1-2)- β -D-ガラクトピラノース (0- α -L-rhamnopyranosyl(1-2)- β -D-galactopyranose) であるクエルセチン-3-0- α -L-ラムノピラノシド-(1-2)- β -D-ガラクトピラノシド (quercetin-3-0- α -L-rhamnopyranosyl(1-2)- β -D-galactopyranoside)、R₁ が 0- α -L-ラムノピラノシド-(1-2)- β -D-ガラクトピラノース (0- α -L-rhamnopyranosyl(1-2)- β -D-galactopyranose) であるクエルセチン-3-0- β -D-ジグルコピラノース (0- β -D-diglucoopyranose) であるクエルセチン-3-0- β -D-ジグルコピラノシド (quercetin-3-0- β -D-diglucoopyranoside)、R₁ が 0- β -D-ガラクトピラノシド-2"-ガレート (0-

10

20

30

40

50

β -D-galactoside-2"-gallate) であるクエルセチン-3-O- β -D-galactoside-2"-gallate)、R₁ が O- β -D-グルコピラノシド-(1-6)- β -D-ガラクトピラノース(O- β -D-glucopyranose) であるクエルセチン-3-O- β -D-グルコピラノシド-(1-6)- β -D-ガラクトピラノシド(querce tin-3-O- β -D-glucopyranoside-(1-6)- β -D-galactopyranoside)、R₁ が O- β -D-グルコピラノシル-(1-3)- α -L-ラムノピラノシド-(1-6)- β -D-ガラクトピラノース(O- β -D-glucopyranosyl-(1-3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-galactopyranose) であるクエルセチン-3-O- β -D-グルコピラノシル-(1-3)- α -L-ラムノピラノシド-(1-6)- β -D-ガラクトピラノシド(querce tin-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1-3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-galactopyranoside)、R₁ が O- β -D-グルクロナイド(O- β -D-glucuronide) であるクエルセチン-3-O- β -D-グルクロナイド(querce tin-3-O- β -D-glucuronide)、R₁ が O- β -D-キシロピラノース(O- β -D-xylopyranose) であるクエルセチン-3-O- β -D-キシロピラノシド(querce tin-3-O- β -D-xylopyranoside)、R₁ が O-ジグルコースピラノース(O-diglucospyranose) であるクエルセチン-3-O-ジグルコピラノシド(querce tin-3-O-diglucospyranoside)、R₁ が O-ゲンチオビオース(O-gentioibiose) であるクエルセチン-3-O-ゲンチオビオシド(querce tin-3-O-gentiobioside)、R₁ が O-グルコピラノシルガラクトピラノース(O-glucopyranosylgalactopyranose) であるクエルセチン-3-O-グルコピラノシルガラクトピラノシド(querce tin-3-O-glucopyranosylgalactopyranoside)、R₁ が O-ネオヘスペリドス(O-neohesperidose) であるクエルセチン-3-O-ネオヘスペリドシドドシド(querce tin-3-O-neohesperi doideside)、R₁ が O-ソフォロース(O-sophorose) であるクエルセチン-3-O-ソフォロシド(querce tin-3-O-sophoroside)、R₁ が ゲンチオトリオース(gentiotriose) であるクエルセチン-3-ゲンチオトリオシド(querce tin-3-gentiotrioside)、R₁ が OCH₃ であるクエルセチン-3-メチルエーテル(querce tin-3-methyl ether)、R₁ が ラムノゲンチオビオース(rhamnogentioibiose) であるクエルセチン-3-ラムノゲンチオビオシド(querce tin-3-rhamnogentioside)、R₁ が ラムノグルコース(rhamnoglucose) であるクエルセチン-3-ラムノグルコシド(querce tin-3-rhamnoglucoside)、R₁ が 硫黄であるクエルセチン-3-硫酸塩(querce tin-3-sulfate) などが含まれる:
 (ii) R₁ が OH であり、R₂ ないし R₅ のうち 3 個の機能グループが OH であり、残り 1 個の機能グループにより相違になる誘導体グループであって、R₄ が OCH₃ であるイソラムネチン(isorhamnetin)、R₃ が O- β -D-クルコピラノース(O- β -D-glucopyranose) であるクエルシメリトリン(querce imetrin)、R₃ が OCH₃ であるラムネチン(rhamnetin)、R₂ が O- β -D-グルコピラノース(O- β -D-glucopyranose) であるクエルセチン-5-O- β -D-グルコピラノシド(querce tin-5-O- β -D-glucopyranoside)、R₃ が O- β -D-クルクロノピラノース(O- β -D-glucuronopyranose) であるクエルセチン-7-O- β -D-グルクロノピラノシド(querce tin-7-O- β -D-glucuronopyranose) である。

10

20

30

40

50

oside)、R₅がO-ケルコース(O-glucose)であるスピレオシド(spiroeooside)などが含まれる; (iii) R₁ないしR₅のうち3個の機能グループがOHであり、残り2個の機能グループにより相違になる誘導体グループであって、R₃とR₄がOCH₃であるラムナジン(rhamnazin)、R₄とR₅がOCH₃であるクエルセチン-3'、4'-ジメチルエーテル(querceatin-3'、4'-dimethyl ether)、R₁とR₄がOCH₃であるクエルセチン-3、3'-ジメチルエーテル(querceatin-3、3'-dimethyl ether)、R₁とR₃がOCH₃であるクエルセチン-3、7-ジメチルエーテル(querceatin-3、7-dimethyl ether)、R₁がO-[2"-0-(6'”-0-p-クマロイル)-β-D-グルコピラノシル]-α-L-ラムノピラノース(10
O-[2"-0-(6'”-0-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranosyl]-α-L-rhamnopyranose)であり、R₃がO-β-D-グルコピラノース(O-β-D-glucopyranose)であるクエルセチン-3-0-[2"-0-(6'”-0-p-クマロイル)-β-D-グルコピラノシル]-α-L-ラムノピラノシド-7-0-β-D-グルコピラノシド(querceatin-3-0-[2"-0-(6'”-0-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranosyl]-α-L-rhamnopyranosyl-7-0-β-D-glucopyranoside)、R₁がO-[2"-0-6'”-0-p-(7'”-0-β-D-グルコピラノシル)クマロイル-β-D-グルコピラノシル]-α-L-ラムノピラノース(20
O-[2"-0-6'”-0-p-(7'”-0-β-D-glucopyranosyl)coumaroyl-β-D-glucopyranosyl]-α-L-rhamnopyranose)であり、R₃がO-β-D-グルコピラノース(O-β-D-glucopyranose)であるクエルセチン-3-0-[2"-0-6'”-0-p-(7'”-0-β-D-グルコピラノシル)クマロイル-β-D-グルコピラノシル]-α-L-ラムノピラノシド-7-0-β-D-グルコピラノシド(querceatin-3-0-[2"-0-6'”-0-p-(7'”-0-β-D-glucopyranosyl)coumaroyl-β-D-glucopyranosyl]-α-L-rhamnopyranoside-7-0-β-D-glucopyranoside)、R₁がO-ルチノース(rutinose)であり、R₃がO-β-D-グルコピラノース(O-β-D-glucopyranose)であるクエルセチン-30
-3-0-ルチノシド-7-0-β-D-グルコピラノシド(querceatin-3-0-rutinoside-7-0-β-D-glucopyranoside)、R₁がO-α-L-アラビノピラノシル(O-α-L-arabinopyranosyl)であり、R₃がO-β-D-グルコピラノース(O-β-D-glucopyranose)であるクエルセチン-3-0-α-L-アラビノピラノシル-7-0-β-D-グルコピラノシド(querceatin-3-0-α-L-arabinopyranosyl-7-0-β-D-glucopyranoside)、R₁がO-ソホロース(O-sophorose)であり、R₃がO-β-D-グルコピラノース(O-β-D-glucopyranose)であるクエルセチン-7-0-β-D-グルコピラノシド-3-0-ソフォロシド(querceatin-7-0-β-D-glucopyranoside)、R₁がO-ガラクトピラノース(O-galactopyranose)であり、R₃がO-グルコピラノース(O-glucopyranose)であるクエルセチン-3-0-ガラクトピラノシル-7-0-ジグルコピラノシド(querceatin-3-0-galactopyranosyl-7-0-diglucopyranoside)、R₁がO-グルコピラノース(O-glucopyranose)であり、R₃がO-グルコピラノース(O-glucopyranose)であるクエルセチン-3-0-グルコピラノシル-7-ジグルコピラノシド(querceatin-3-0-glucopyranosyl-7-diglucopyranoside)、R₁がグルコピラノース(glucopyranose)であり、R₃がグルコピラノース(glucopyranose)であるクエルセチン-3、7-ジ(50

グルコピラノシド (quercetin-3、7-diglucopyranoside)、R₁ がゲンチオビオース (gentiobiose) であり、R₃ がグルコピラノース (glucopyranose) であるクエルセチン-3-ゲンチオビオシル-7-グルコピラノシド (quercetin-3-gentiobiosyl-7-glucopyranoside)、R₁ と R₅ が O-β-D-グルコピラノース (O-β-D-glucopyranose) であるクエルセチン-3、4'-ジ-O-β-D-グルコピラノシド (quercetin-3、4'-di-O-β-D-glucopyranoside) などが含まれる；(iv) その他、3 個以上の機能グループが変化された誘導体グループであって、R₁、R₃ 及び R₅ が OCH₃ であり、R₂ 及び R₄ が OH であるクエルセチン-3、4'、7-トリメチルエーテル (quercetin-3、4'、7-trimethyl ether)、R₁、R₃、R₄ 及び R₅ が OCH₃ であり、R₂ が OH であるクエルセチン-3、3'、4'、7-テトラメチルエーテル (quercetin-3、3'、4'、7-tetramethyl ether) などが含まれる。

前記一般式 (I) において R₁ ないし R₅ が全て OH であるクエルセチン (quercetin) は自然界に存する 4000 余種の植物から得られるフェノール系化合物 (phenolic compound) であって、C₁₅H₁₀O₇ の分子式と 302.33 g/mole の分子量を有する植物エストロゼンの一一種で、化学構造において、大きい共鳴構造を有しており、1936 年に最初にその構造が明らかになった後、ビタミン P (vitamin P) とも知られている。一般に、クエルセチンは通常に糖類が β-結合した配糖体であるルチン (rutin) であって、クローバ花、ブタクサ花粉、多様な植物の皮と筋だけではなく、玉ねぎ、ケール、ブロッコリ、レタース、トマト、りんごなどに幅広く分布されている。クエルセチンの作用に対する研究結果、今まで主に毛細管壁の伸縮性 (capillary wall integrity) 及び毛細管抵抗性 (capillary resistance) 維持に大事な役割を果たすのみならず (参照: Gabor et al.、Progress in Clinical and Biological Research、280: 1-15、1988; Havasteen et al.、Biochemical Pharmacology、32: 1141-1448、1983)、酸化防止作用、ビタミン P 作用、紫外線吸収作用、高血圧抑制、抗不整脈作用 (antiarrhythmic activity)、抗炎症、抗アレルギ性、血中コレステロール低下、肝毒性抑制、不妊の治療作用などを有しているため、食べ物、医薬品、化粧品などにその応用が期待されているが、今まで骨粗鬆症予防または治療と関連してクエルセチンを使用した例は報告されたことがなかった。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明のクエルセチン誘導体を有効成分として含有する骨粗鬆症治療剤を詳述する。

本発明者らはクエルセチン誘導体が骨芽細胞 (osteoblast) 及び破骨細胞 (osteoclast) の細胞増殖に与える効果を検索するため、骨粗鬆症治療効果があると知られている植物エストロゼン (phytoestrogen) であるゲニステイン (genistein) とクエルセチンの骨粗鬆症治療効果を比較した結果、クエルセチンはゲニステインより骨芽細胞の細胞増殖促進効果及びアルカリホスファターゼ (ALP) 活性増加効果に優れ、破骨細胞は細胞増殖抑制効果が優秀であることを確認した。かつ、卵巣摘出白鼠に対する動物実験結果、クエルセチン誘導体の投与が体内ホルモンの変化を大きく引き起こさなかったところ、現在骨粗鬆症の治療剤として使用されているエストラジオールの副作用である子宮肥厚などを誘発しない安全な薬物であることが確認できた。また、クエルセチン誘導体は海綿骨の面積変化の多い脛骨でエストラジオールより海綿骨の面積増加効果が高く現れ、造血機能や免疫系にいずれの影響を与えないことと確認された。

従って、前記結果により、本発明のクエルセチン誘導体は、従来の骨粗鬆症治療剤として主に使用されていた植物エストロゼンであるゲニステインに比べ、骨芽細胞の細胞増殖促

10

20

30

40

50

進効果及び破骨細胞の細胞増殖抑制効果が優秀でのみならず副作用が少なく、体内ホルモンの変化を大きく誘発せず造血機能や免疫系に影響を与えない安全な薬物であって、骨粗鬆症治療剤または予防剤として有用に使用されうることが分かった。

【製剤化】

前記骨粗鬆症治療効果に優れたクエルセチン誘導体は薬学的に許容可能な結合剤（例えば、ポリビニールピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース）、崩解剤（例えば、カルボキシメチルセルロースカルシウム、澱粉グリコール酸ナトリウム）、稀釀剤（例えば、トウモロコシ澱粉、乳糖、大豆油、結晶セルロース、マンニトール）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク）、甘味剤（例えば、白糖、果糖、ソルビトール、アスパータム）、安定剤（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、 α または β シクロデキストリン、ビタミンC、クエン酸、白礦）、保存料（例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸プロピル、安息香酸ナトリウム）及び香料（例えば、エチルバニリン、マスキングフラボール、メントルフラボノ、ハーブ香）と混合して錠剤、カプセル剤、軟質カプセル剤、液剤、軟膏剤、丸剤、散剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、坐剤または注射剤などの経口投与剤または非経口投与剤などの薬学的製剤に製造されうる。かつ、骨粗鬆症予防及び治療剤としての効能増進のためにカルシウムやビタミンD₃を製剤化時に添加できる。特に、本発明の薬学的組成物を非経口に投与する場合、非経口投与は皮下注射、静脈注射、筋肉内注射または胸部内注射注入方式による。非経口投与用剤型に製造化するためクエルセチン誘導体を安定剤または緩衝剤と共に水で混合して溶液または懸濁液で製造し、これをアンプルまたはバイアルの単位投与型に製剤化できる。10
20

【投与量】

本発明の骨粗鬆症治療剤の薬学的組成物において、クエルセチン誘導体の有効量は2ないし20mg/kg、望ましくは8ないし12mg/kgであり、前記有効容量は患者の年齢、性別、症状、投与法、予防目的により1日1回以上を患者に投与できる。

【クエルセチンの安全性】

本発明のクエルセチン誘導体はマウスに経口投与時及び腹腔内投与時の毒性を試験した結果、経口毒性試験による50%致死量(LD₅₀)は少なくとも160mg/kg以上なので、既に安全性が報告されており(参照:M. Sullivan et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 77: 269, 1951)、本発明では肝、腎臓、脳、子宮、皮膚、脛骨を対象に副作用を調べて見たところ、肝、腎臓、脳、脛骨及び皮膚の重さに影響を与えることなく、特に現在骨粗鬆症治療剤が有している副作用である子宮肥厚を表さなかったところ、本発明のクエルセチン誘導体がホルモン製剤として骨粗鬆症治療に安全に使用されうることを再確認することができた。30

以下、実施例を通して本発明をさらに詳述する。これら実施例はただ本発明をさらに具体的に説明するためのもので、本発明の要旨により本発明の範囲がこれら実施例により限られないことは当業界において通常の知識を持つ者にとって自明であろう。

【実施例1】：骨芽細胞の細胞増殖効果

クエルセチンが骨芽細胞(osteoblast)の細胞増殖に及ぼす効果を検索するため、人の類似骨芽細胞株(human osteoblast-like cell line)であるSaos-2細胞を使用して、植物エストロゼン(phytostrogen)の一一種であつて現在骨粗鬆症治療剤として多くの研究がなされているゲニステイン(genistein)を比較物質にして骨芽細胞の細胞増殖に及ぼす効果を次のように検索した。40

【実施例1-1】：骨芽細胞の選別及び細胞培養

骨の構成成分である骨芽細胞に似ている性質を示すSaos-2細胞株をソウル大学医学部癌研究所(Cancer Research Institute)の韓国細胞株バンク(Korean Cell Line Bank)から分譲され実験に使用した。

Saos-2細胞は10%(v/v)FBS、ペニシリソ100unit/ml、ストレptomycin100μg/mlを含むRPMI 1640培地(Gibco BRL, U.S.A.)を使用して湿式条件、37℃で5%(v/v)CO₂培養器で培養し、培地50

は1週間に2～3回交換し、1週間に1回継代培養した。前記細胞株は培養プラスコに単一層(mono layer)を形成し成長する特性があるため、継代培養時は0.25% (w/v)トリップシン(trypsin)溶液を使用して単一層を剥離させた。

【実施例1-2】：薬物の濃度による細胞増殖実験

Saos-2細胞株を96-ウェルプレートに20,000細胞/ウェルに分配しクエルセチン(1% in DMSO(dimethylsulfoxide))を 10^{-2} ～ 10^{-9} mg/mlの濃度になるよう各濃度別に6つのウェルに添加した。一方、対照群としてはクエルセチンを添加しないものを使用し、比較群としては現在骨粗鬆症治療剤として主に研究されているゲニステインを濃度別にウェルに添加した。次いで、37℃培養器で3日間培養し、これにMTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Triazolyl Blue)を0.05mg/ml濃度に加えて同一な条件下で4時間さらに培養した後、生きている細胞数に比例して生成された濃い紫色のフォルマザン(formazan)結晶をDMSOで溶解させエリサリーダー(ELISA reader)で550nmにおける吸光度を測定した。この際、細胞増殖率(%)は下記の式のように、クエルセチンを添加しない対照群ウェルの吸光度に対するクエルセチン添加ウェルの吸光度の比として計算し、クエルセチンを同様な濃度で処理した6個ウェルの値の平均を計算してクエルセチンによる骨芽細胞増殖率(%)を比較した(参照:表1)。

$$\text{細胞増殖率(%)} = \frac{\text{クエルセチン添加ウェルのOD } 550\text{ nm平均} - \text{空ウェルのOD } 550\text{ nm平均}}{\text{対照群ウェルのOD } 550\text{ nm平均値}} \times 100$$

10

20

【実施例1-3】：アルカリホスファターゼ(ALP)活性検索

骨芽細胞は細胞特異的にアルカリホスファターゼ(alkaline phosphatase, ALP)活性を示すので、本発明に係るクエルセチンが骨芽細胞でALP活性に与える影響を下記のような方法により調べて見た:前記実施例1-2のMTT実験でと同一な細胞数のSaos-2細胞株に試験物質を同一な濃度に処理し同一な条件下で3日間培養後収穫した。この際、比較群としてはゲニステインを使用した。一方、ALPがp-ニトロフェニルfosfate(p-nitrophenylphosphate)をp-ニトロフェノール(p-nitrophenol)とfosfate(phosphate)に分解させることを用いて405nmにおける吸光度の変化を分析してALP活性を測定した(参照:表1)。

30

【表1】

クエルセチンによる骨芽細胞の細胞増殖効果

濃度 (mg/ml)	クエルセチン(対照群の%)		ゲニステイン(対照群の%)	
	MTT検索法	ALP活性	MTT検索法	ALP活性
対照群	100.0 ±2.5	100.0 ±1.6	100.0 ±0.6	100.0 ±7.3
1 ×10 ⁻⁹	93.1 ±0.8*	98.1 ±0.0	91.3 ±0.6*	106.1 ±6.4
1 ×10 ⁻⁸	93.9 ±0.8	104.4 ±3.9	96.9 ±2.7	101.5 ±8.8
1 ×10 ⁻⁷	98.6 ±1.0	101.2 ±3.1	95.9 ±1.6	109.3 ±9.6
1 ×10 ⁻⁶	96.0 ±1.0	127.2 ±3.5**	90.5 ±0.9**	103.8 ±8.7
1 ×10 ⁻⁵	95.8 ±1.1	116.5 ±3.7	97.3 ±1.6	113.5 ±7.3
1 ×10 ⁻⁴	96.5 ±0.8	113.5 ±2.3	95.7 ±0.7	121.1 ±6.2
1 ×10 ⁻³	98.3 ±0.8	107.3 ±1.5	85.5 ±1.1**	98.8 ±6.9
1 ×10 ⁻²	108.6 ±2.2**	106.1 ±4.3	66.2 ±2.8**	62.3 ±3.4

*: p<0.05

**: p<0.01

前記表1に示した通り、MTT検索法を通じた細胞増殖実験においてクエルセチンは1×10⁻⁹～1×10⁻³ mg/m^l濃度では薬物を処理しない対照群と細胞増殖効果にさほど違いがないと現れたが、1×10⁻² mg/m^lの濃度では対照群の約109%に当る最大細胞増殖効果を示すことが分かった(p<0.01)。一方、比較物質として使用したゲニステインをMTT検索において1×10⁻⁹～1×10⁻² mg/m^lの濃度で処理した場合、1×10⁻⁹ mg/m^l濃度で対照群の91%(p<0.05)、1×10⁻⁶ mg/m^l濃度で90.5%(p<0.01)、1×10⁻³ mg/m^l濃度で86%(p<0.01)、それから1×10⁻² mg/m^l濃度で66%(p<0.01)に現れたところ、ゲニステインは骨芽細胞の細胞増殖を促進する効果を示すことよりもかえって骨芽細胞の細胞増殖を抑える効果を示すことが確認できた。

かつ、ALP活性においてクエルセチンは1×10⁻⁶ mg/m^l濃度で対照群の127%で最大ALP活性を示した(p<0.01)一方、ゲニステインは1×10⁻⁴ mg/m^l濃度で対照群の121%でALP活性効果を示したため、ALP活性面において本発明のクエルセチンはゲニステインより約100倍以上の活性を示したことが分かるところ、現在骨粗鬆症治療剤として研究されているゲニステインより本発明のクエルセチンが骨芽細胞の細胞増殖促進効果及びALP活性増加効果に優れることを確認することができた。

【実施例2】：破骨細胞の細胞増殖効果

クエルセチンが破骨細胞(osteoclast)の増殖を抑えられるかを調べるために、下記のような実験を施した。

【実施例2-1】：破骨細胞の選別及び細胞培養

ICRマウス(韓国化学研究所、大田、韓国)に4週間カルシウム欠乏食餌(ICN Biomedicals, Inc., Ohio, U.S.A.)を提供しつつ破骨細胞の活性を増加させた。このようなマウスの左右脛骨と大腿骨を周りの筋肉組織なしで奇麗に切り取った後、クリーンベンチで大腿骨と左右脛骨を細分して予め氷に入れておいたペニシリソル100unit/m^lとストレプトマイシン100μg/m^lを含有するα-ME

10

20

30

40

50

Mに入れて1分間強く振盪して破骨細胞を培地で抽出した。これを氷に5分間放置した後、細胞浮遊液を $800 \times g$ で3分間遠心分離し、沈殿された細胞をペニシリソ $100 \text{ unit}/\text{ml}$ とストレプトマイシン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 及び0% (v/v) FBSを含有する α -MEMの培養培地に浮遊させた。培養培地に浮遊させた細胞を 24 -ウェルプレートにウェル当たり 3.5×10^6 細胞数を分配した。

【実施例2-2】：薬物の濃度による細胞増殖実験

前記実施例2-1の破骨細胞にクエルセチンを 1×10^{-8} ないし $1 \times 10^{-2} \text{ mg}/\text{ml}$ 濃度で添加し、二日目に市販されるキット (kit) (Sigma Chemical Co., U.S.A.) を使用してTRAP染色 (Tartrate-resistant acid phosphatase staining) を施した。次いで、TRAP染色により赤色を帯びる三つ以上の核を有するTRAP-陽性細胞 (TRAP-positive MNC) を破骨細胞と判定して、その数を算定することにより破骨細胞の数を測定した (参照: 表2)。

【表2】

クエルセチンによる破骨細胞の細胞増殖効果

濃度 (mg/ml)	破骨細胞の(対照群の%)
対照群	100.0±8.1
1×10^{-8}	100.9±1.8
1×10^{-6}	96.8±2.7
1×10^{-4}	89.6±3.2
1×10^{-3}	61.1±4.1*
1×10^{-2}	24.7±5.7**

*: $p < 0.05$,

**: $p < 0.01$

前記表2に示した通り、クエルセチンの濃度が 1×10^{-8} ないし $1 \times 10^{-4} \text{ mg}/\text{ml}$ の場合、破骨細胞の細胞増殖抑制効果がさほど高くなかったが、 $1 \times 10^{-3} \text{ mg}/\text{ml}$ 濃度では対照群の61% ($p < 0.05$)、 $1 \times 10^{-2} \text{ mg}/\text{ml}$ 濃度では対照群の25% ($p < 0.01$) に細胞増殖が抑えられるところ、クエルセチンが破骨細胞の細胞増殖を著しく抑えることを確認することができた。

前記実施例1及び2の結果から、本発明のクエルセチンは $1 \times 10^{-2} \text{ mg}/\text{ml}$ 濃度で骨芽細胞の細胞増殖促進効果及び破骨細胞の細胞増殖抑制効果を全て示す骨粗鬆症治療剤の理想的な薬物であることを確認することができた。

【実施例3】：卵巣摘出白鼠に対するクエルセチンの効果

閉経期以後第I型 (type I) 骨粗鬆症が発病するSD (Sprague-Dawley) 系の雌白鼠を対象にしてクエルセチンの効果を実験した。実験材料としては韓国化学研究所で分譲された生後10週になった体重200~300gほどの雌白鼠を使用し、実験過程は白鼠の卵巣摘出術の施行、各群による薬物投与、摘出術後一定期間毎にネズミを犠牲して体重変化、体内臓器組織観察、海綿骨面積の変化、全血球数及び血漿の生化学的検査に分けて次のように実験を行った。

【実施例3-1】：卵巣摘出術及び薬物投与

卵巣摘出術はSham群 (正常群) を除き対照群と試験群の全ての雌白鼠で両側卵巣摘出術を次のように試行した：ケタミン (Ketamine、柳韓洋行、韓国) $5 \text{ mg}/100 \text{ g}$ とキシラジン (Xylazine、韓国ヴァイエル、韓国) $1 \text{ mg}/100 \text{ g}$ を白鼠の左側及び右側後肢大腿根に筋肉注射して雌白鼠を全身麻酔させた後、下腹部の毛を除去し動物の体位を横にならした状態でポタジン液 (ヨード、三一製薬、韓国) で手術部位を

10

20

30

40

50

消毒した後、無菌操作下で正中線を中心に下腹部で 2 cm ほどに皮膚・腹筋及び腹膜を切開し、消毒されたピンセットで卵巣を露出させ卵管を絹糸で結紮した後左右卵巣を摘出した。次いで、抗生剤（スルファポルテー 4、ユニ化学株式会社、韓国）0.3 ml を腹腔内に注入して感染を防止したし、絹糸及びナイロン糸で腹膜、腹筋及び皮膚を縫合した。また、Sham群は卵巣摘出を除いた全ての手術を行った動物で卵巣を摘出し薬物投与を行わない対照群の卵巣摘出による変化を比較するために使用されたし、対照群は卵巣摘出術を行い薬物投与を施した投与群の動物と比較して薬物投与による変化を比較するために使用された。

薬物投与時、薬物投与前後一定期間中（卵巣摘出前、摘出後、投与 1 ~ 9 週）血液を尾静脈内でカテーテル（B. D 社：24G）を用いて 1.5 ml 採取（heparin: 75 IU 10）し全血球数測定（Coulter 社：JT）及び血漿の生化学的検査（Crony 社：エアロン 200）を施し、剖検時後大静脈で採血して前述したような分析を施した後、大腿骨内の海綿骨面積の変化及び体内臓器組織の観察のために各試料を冷凍保管した。

卵巣摘出後、1 週後から Sham群と対照群は 10% Tween 80 溶液を、E2 群は 17 β-エストラジオールを 1 μg / kg / day に、試験薬物投与群は試験薬物でクエルセチンまたはゲニステインをそれぞれ 10 mg / kg / day 濃度で 9 週間腹腔注射して、毎週各群の体重変化を測定した。投与後、1 週間に 1 回ずつ採血し、9 週間投与した後はできるだけ血液全量をヘパリンで処理して取った後、CBC (Complete Blood Count) 検査を行い 3,000 rpm で 20 分間遠心分離して血漿を取った後次の実験まで -70 °C で冷凍保管した。かつ骨密度検査のため、5、6 番腰椎骨 (lumbus)、右側の脛骨 (tibia) を分離し、4% (v/v) フォルマリン (formalin) 溶液に保管した。 20

【実施例 3-2】：クエルセチンの投与による体重変化

前記実施例 3-1 の Sham群、17 β-エストラジオールが処理された E2 群、クエルセチンまたはゲニステインがそれぞれ処理された試験薬物群の体重を手術後 10 週間毎週測定した（参照：表 3）。

【表 3】

薬物投与による体重変化測定

週	体重(g)				
	対照群	Sham群	E 2群	クエルセチン 処理群	ゲニステイン処理 群
手術前	219.39±4.05	220.70±4.6 3	228.51±8.1 1	221.87±7.57	217.55±7.24
手術後1	244.98±3.00	231.51±4.6 8	249.50±8.1 6	241.73±4.83	242.12±5.96
手術後2	274.29±3.68**	236.40±5.0 6**	264.97±8.3 5	271.70±5.79**	270.00±8.05**
手術後3	299.37±3.74**	245.56±4.7 9**	279.87±8.1 5**	295.00±3.89**	296.20±7.68**
手術後4	315.20±3.84**	248.96±5.0 2***	292.83±9.2 5**	312.07±5.95**	310.80±7.80**
手術後5	320.30±4.83**	255.43±5.1 4***	296.96±9.4 4**	320.25±6.7 6**	317.29±7.93**
手術後6	329.03±5.05**	261.49±6.46*** 6.46***	304.49±8.4 0**	326.68±6.7 3**	327.19±8.31**
手術後7	337.39±5.93**	264.78±5.53*** 5.53***	313.04±8.7 3**	333.25±7.6 1**	332.80±9.23**
手術後8	340.01±6.60**	268.16±5.40*** 5.40***	315.87±8.3 2**	335.09±6.6 5**	336.38±9.01**
手術後9	347.96±7.58**	273.81±4.54*** 4.54***	319.95±9.4 7**	343.02±6.9 6**	342.71±8.26**
手術後 10	356.73±7.13**	275.22±4.30*** 4.30***	320.00±5.9 0***	346.27±6.3 9**	347.23±7.57**

*: p<0.05, **: p<0.01, 手術前と比較,

#: p<0.05, #: p<0.01, 対照群と比較,

前記表3に示した通り、Sham群は手術後3週($p < 0.05$)から手術前と比較して体重が増加し、対照群は手術後2週($p < 0.01$)から体重が増加された。すなわち、対照群はSham群に比べて急激な体重の増加を示したが、このような体重の増加はエストラジオールの投与により鈍化され、E 2群の手術後20週では対照群と比較して低い体重増加を示した($p < 0.05$)。一方、植物エストロゼンの一種であるクエルセチンとゲニステインが10mg/kg/day濃度で投与された試験薬物群では卵巣摘出後も対照群と類似に急激な体重増加を示すことを確認することができた。従って、クエルセチンの投与が体内ホルモンの変化を大幅に誘発させないことを確認できた。

【実施例3-3】: クエルセチンによる体内臓器組織の重さ変化

実験動物に投与されたクエルセチンが体内臓器組織に与える影響を調べるために、手術後9週間薬物を投与した実験動物から肝(liver)、腎臓(kidney)、脳(brain)

10

20

30

40

50

in)、子宮(uterus)、皮膚(skin)、脛骨(tibia)を摘出してそれぞれの重さ(wet weight)を測定した(参照:表4)

【表4】

薬物投与後体内長期組織の重さ変化

	対照群	Sham群	E 2群	クエルセチ ン 処理群	ゲニステイ ン 処理群
肝(g)	9.84± 0.33	9.52± 0.48	9.22± 0.43	9.07±0.30	10.03± 0.36
腎臓(g)	1.95±0. 09	1.91±0. 05	1.85±0. 09	1.84±0.05	1.83±0.03
脳(g)	2.03± 0.04	1.93±0. 02	1.98±0. 05	1.98±0.04	1.98±0.03
脛骨(g)	0.559± 0.025	0.514± 0.013	0.504± 0.019	0.554±0.0 19	0.537± 0.008
皮膚 (mg)	193±7	169±8	193±6	197±11	188±9
子宮 (mg)	79±4	450±29*	279±10**	85±6	106±3

**: p<0.01

前記表4に示した通り、肝、腎臓、脳、脛骨及び皮膚の重さは正常対照群であるSham群と卵巣摘出対照群及び薬物投与群の全てで差を示さなかつたが、卵巣から分泌されるエストロゼンにより影響される子宮の重さはSham群に比べて卵巣摘出対照群で大幅に減少され($p < 0.01$)、卵巣摘出後E 2の投与はこのような子宮の退化を抑えた(対照群と比較して $p < 0.01$)。一方、植物エストロゼンであるクエルセチンとゲニステインの投与は子宮の重さを変らせないところ、現在骨粗鬆症の治療剤として使用されているE 2は子宮肥厚などの副作用がある一方、クエルセチンはE 2のような副作用が現れなくクエルセチンを安全に薬物として使用可能なことを確認することができた。

【実施例3-4】: クエルセチンの投与による海綿骨面積の変化

9週間薬物を投与した各群から摘出された腰椎骨(lumbbar)及び脛骨(tibia)における海綿骨の面積(trabecular bone area, TBA)は次のような方法により測定した: すなわち、定量的映像分析器(Quantitative image analysis system, Wild Leitz Co.)のデジタル化装置(digitizer)で各海綿の輪郭線に沿って描いてコンピュータ画面に映像を得、各脛骨の近位部で成長板の直下部のうち横辺の長さが成長板の長さの約2/3ほどになる長さに基準面積 $2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ である長方形の内部に存する海綿骨の平均面積をコンピュータを用いて求めた。かつ、その長方形の内部の海綿骨の個数を求めた後、平均面積に個数をかけてそれぞれの骨標本の海綿骨の面積を求めた後統計処理した(参照:表5)。

【表5】

10

20

30

40

薬物投与による脛骨の海綿骨面積(TBA)の変化

	TBA ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)	増減率 (%)
対照群	34.62 ± 2.62	100.00 ± 7.55
Sham群	85.55 ± 5.31**	247.07 ± 15.33**
E 2 処理群	51.40 ± 2.28	148.46 ± 6.59
クエルセチン処理群	55.52 ± 7.68*	160.34 ± 22.17*
ゲニステイン処理群	47.65 ± 2.07	137.62 ± 5.98

*: p<0.05,

**: p<0.01

前記表5に示した通り、脛骨の場合対照群は $34.62 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ で正常群であるS h a m群の $85.55 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ に比べて大幅に減少され ($p < 0.01$) 骨粗鬆症が誘発されていることが分かり、このような海綿骨の減少は E 2、クエルセチン及びゲニステインの処理によりそれぞれ対照群の 148%、160% 及び 138% に海綿骨の面積が増加する傾向があり、特にクエルセチンを処理する場合、海綿骨面積の増加が著しい ($p < 0.05$) ことが分かった。

前記と同様な測定方法を用いて実験動物に 9 週間の薬物投与後摘出した腰椎骨 (lumb ar) における海綿骨の面積を測定した (参照: 表6)。

【表6】

薬物投与による腰椎骨の海綿骨面積(TBA)の変化

	TBA ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)	増減率 (%)
対照群	67.53 ± 2.31	100.00 ± 3.42
Sham群	93.70 ± 5.29**	138.76 ± 7.84**
E 2 処理群	89.16 ± 2.83**	132.04 ± 4.19**
クエルセチン処理群	87.38 ± 4.53*	129.40 ± 6.71*
ジェニステイン処理群	86.58 ± 3.00*	128.23 ± 4.45*

*: p<0.05,

**: p<0.01

前記表6に示した通り、腰椎骨の場合対照群は $67.53 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ であって S h a m群の $93.70 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ に比べて減少されるが ($p < 0.01$) E 2、クエルセチン及びゲニステインの投与でそれぞれ対照群の 132% ($p < 0.01$)、129% ($p < 0.05$) 及び 128% ($p < 0.05$) に増加され卵巣摘出により誘発された海綿骨面積の減少を抑える効果があることと現れた。特に、クエルセチンは海綿骨の面積変化

が多い脛骨で現在治療剤として使用されるE 2より海綿骨の面積増加効果が高く現れたし、E 2の副作用である子宮の肥厚現象も現れなかつたため、骨粗鬆症治療剤としてクエルセチンがE 2よりさらに効果的であることが分かった。

【実施例3-5】：全血球数の測定

体内の状態及び異常現象をそのまま反映する血液の全血球数 (complement blood cell, CBC) を測定して薬物投与による実験動物の異常有無を判明した。すなわち、手術前のネズミから得られた血液と手術後薬物を投与し、10週が経過されたネズミから得られた血液の赤血球 (red blood cell, RBC) の数、血色素 (hemoglobin, Hb) の濃度及び赤血球容積比 (hematocrit, Ht) を測定して造血機能の異常有無を調べ、白血球の数、リンパ球の数、単核球の数及び顆粒球の数を測定して比較することにより、炎症反応や組織の壊死など免疫系の異常有無を判断した（参照：表7）。

【表7】

薬物投与による全血球数の変化

	手術	対照群	Sham群	E 2群	クエルセチ ン 処理群	ゲニステ イン 処理群
赤血球の数 ($\times 10^6$ cells/ μ l)	前	7.36± 0.11	7.19± 0.11	7.33± 0.13	7.29± 0.15	7.32± 0.13
	後	7.08± 0.09	6.75± 0.24	6.97± 0.14	7.13± 0.15	7.17± 0.13
血色素の濃度 (g/dl)	前	16.09± 0.21	15.75± 0.20	15.86± 0.24	16.00±0.3 0	15.82± 0.27
	後	14.58± 0.20**	14.09± 0.48**	14.34± 0.29**	14.84± 0.22*	14.70± 0.22**
赤血球容積比 (%)	前	43.34± 0.48	43.09± 0.61	43.11± 0.55	43.62± 0.83	42.76± 0.65
	後	39.48± 0.60**	38.39± 1.24**	38.86± 0.72**	41.10± 0.68*	40.66± 0.56*

10

20

30

白血球の数 ($\times 10^3$ cells/ μl)	前	26.13± 4.63	25.61± 3.64	23.14± 1.50	20.28± 3.77	27.30± 4.85
	後	21.66± 2.89	12.74± 2.88*	13.26± 0.97**	18.50± 7.60	21.50± 2.53
リンパ球の数 ($\times 10^3$ cells/ μl)	前	22.14± 4.49	18.04± 2.38	17.80± 1.72	16.78± 3.52	19.68± 4.52
	後	21.20± 9.00	10.20± 2.88	10.23± 0.96**	15.00± 7.71	15.25± 3.21
単核球の数 ($\times 10^3$ cells/ μl)	前	1.02± 0.18	0.73± 0.17	1.44± 0.29	0.65± 0.07	0.77± 0.09
	後	1.10± 0.21	0.95± 0.14	1.02± 0.24	1.00± 0.20	0.80± 0.19
顆粒球の数 ($\times 10^3$ cells/ μl)	前	2.99± 0.44	2.83± 0.39	3.67± 0.40	2.80± 0.30	2.23± 0.10
	後	2.52± 0.21	1.93± 0.26	1.99± 0.25**	2.43± 0.12	2.38± 0.37

*: p<0.05,

**: p<0.01

前記表7に示した通り、赤血球の数は全ての群で手術前と手術後に全く変化がなく、血色素の濃度及び赤血球容積比は全ての群で手術後に減少された。一方、白血球の数は対照群とクエルセチン及びゲニステインの投与群で手術前と手術後に変化がなかったが、S h a m 群及びE 2 群では手術後に減少することが分かった。かつ、リンパ球と顆粒球はE 2 群でのみ急激に減り、単核球は全ての群で変化がなかった。従って、クエルセチンの投与は造血機能や免疫系に影響を与えない安全な薬物であることが確認できた。

【実施例3-6】：クエルセチンによる血漿の生化学的变化

血液は身体の状態をそのまま反映するので、血漿内の色々の生化学的指標を検査してクエルセチンの体内安定性を確認した：すなわち、手術前ネズミの血液、手術後1週が経過されたネズミの血液及び手術後10週経過したネズミの血液を修得し、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase、ALP)、カルシウム、無機磷酸 (inorganic phosphate)、血中尿素窒素 (blood urea nitrogen、BUN)、クレアチニン、総コレステロール、HDL-コレステロール及びLDL-コレステロールの血中数値を測定した（参照：表8）。

【表8】

10

20

30

薬物投与による血漿内生化学的指標の変化

項目	手術	対照群	Sham群	E 2群	クエルセチ ン 処理群	ゲニステ イン 処理群
ALPの濃度 (U/dL)	前	262.75± 23.31	245.59±2 2.05	196.01± 28.34	232.83±2 0.27	208.86± 19.72
	1週	265.75± 22.78	215.18± 20.22	195.24± 27.87	226.67± 23.20	212.10± 17.92
	10週	198.31± 14.64	135.09± 18.64 ^{**}	123.99± 22.18	156.42±1 3.08	127.14±9. 95 ^{***}
カルシウムの濃度 (mg/dL)	前	10.48± 0.43	10.57± 0.55	10.86± 0.40	10.73± 0.48	10.61± 0.49
	1週	9.98± 0.34	10.35± 0.17	10.03± 0.18	8.37± 0.24 ^{**}	8.97± 0.29 [*]
	10週	10.83± 0.16	11.79± 0.23 ^{**}	11.20± 0.16 ^s	10.26±0. 19 ^s	10.44±0.2 2 ^s
無機磷酸の濃度 (mg/dL)	前	6.52±0.3 9	6.87±0.6 2	6.90±0. 52	6.79± 0.66	7.18±0.48
	1週	6.27± 0.31	6.59± 0.20	6.13±0. 12	6.21±0.1 8	6.47±0.16
	10週	4.95± 0.41 ^{**}	6.09± 0.47	5.51± 0.45	5.73± 0.58	5.62± 0.25 [*]
血中尿素 窒素の濃度 (mg/dL)	前	18.56±0. 92	17.13±1. 11	18.36± 1.01	17.05± 0.60	16.82± 0.60
	1週	18.31± 0.70	16.75± 0.58	17.79± 0.76	18.06±0. 88	18.26±0.9 4
	10週	21.20± 1.06	19.23± 0.84	19.99± 0.86	18.19± 0.41	18.31± 0.86
	クレアチニンの濃度	前	0.54±0.0 5	0.56±0.0 6	0.55±0. 05	0.57±0.0 5

10

20

30

40

度 (mg/dL)	1週	0.54± 0.05	0.62± 0.04	0.57± 0.03	0.59± 0.01	0.64± 0.02*
	10 週	0.78± 0.03**\$	0.80± 0.03**	0.81± 0.03***	0.82±0.0 4***	0.82±0.04 **\$
総コレス テロール の濃度 (mg/dL)	前	72.66± 5.00	79.67± 1.73	76.79± 2.80	77.55± 5.13	85.51± 5.45
	1週	93.32± 4.75*	79.75± 2.46	95.53± 4.17	85.84±3. 82	91.56±3.6 5
	10 週	120.44± 5.21***	88.60± 4.87**	115.05± 5.75***	107.73± 2.24**	121.07±6. 53**
HDL-コレ ステロ一 ルの濃度 (mg/dL)	前	53.78±2. 77	52.33±2. 61	52.30± 2.01	53.38± 3.14	61.12± 3.57
	1週	46.20± 0.62	41.69± 1.47	49.03± 3.37	42.49±4. 85	35.26±1.9 2**
	10 週	29.60± 2.63***	22.32± 2.49***	24.94± 2.72***	25.13± 2.78**	29.27± 1.98**
LDL-コレ ステロ一 ルの濃度 (mg/dL)	前	18.88±3. 15	26.63±3. 04	24.49± 1.63	24.17± 3.13	24.39± 3.63
	1週	42.80± 6.41**	36.30± 0.63	40.50± 6.17	40.85±4. 88	60.47±7.0 4**
	10 週	90.84± 4.27***	69.29± 3.05***	88.33± 4.74***	82.60± 4.85***	91.80± 6.57***

*: p<0.05, **: p<0.01, 対照群と比較

30

#: p<0.05, ##: p<0.01, 手術前と比較

40

\$: p<0.05, \$\$: p<0.01, 手術後1週と比較

前記表8に示した通り、骨代謝に直接に関わりのあるALPは全ての群で週令の増加により活性度が減少する傾向を示したが、特にSham群とゲニステイン投与群では手術前及び手術後1週経過したネズミに比べ、手術後10週経過したネズミにおいて大幅に減り、カルシウムの濃度はさほど変らなく、無機磷酸は対照群及びゲニステイン投与群で手術前に比べて手術後10週経過されたネズミで大きく減少された。

一方、タンパク質代謝及び筋肉量と関わりある血中尿素窒素は全ての群において適正レベルを維持したが、クレアチニンは全ての群で増加された。

かつ、閉経期以降の女性にとって増加すると報告された総コレステロールの量も全ての群で増加する様相を示したが、Sham群は比較的低い増加率を示した。また、HDL-コレステロールは全ての群において経時的に減少することに比べ、LDL-コレステロールは経時的に増加する傾向を示した。このような現象は正常群であるSham群や卵巣摘出実験群において全て同じく現れた。

従って、本発明に係るクエルセチンは骨粗鬆症の予防及び治療に効果的に使用されうることが分かった。

【実施例4】：クエルセチンの製剤化

【実施例4-1】：シロップ剤の製造

本発明のクエルセチン、その誘導体及び薬学的に許容されるその塩を有効成分2% (w/

50

v) で含有するシロップを次のような方法で製造した：クエルセチンの塩酸塩、サッカリン、糖を温水 80 g に溶解させ冷却させた後、グリセリン、サッカリン、香味料、エタノール、ソルビン酸及び蒸溜水を含有する溶液を製造して混合した後、この混合物に水を添加して 100 ml のクエルセチンシロップ剤を製造した。前記シロップ剤の成分は次の通りである：

クエルセチンの塩酸塩	2 g
サッカリン	0.8 g
糖	25.4 g
グリセリン	8.0 g
香味料	0.04 g
エタノール	4.0 g
ソルビン酸	0.4 g
蒸溜水	適量

10

【実施例 4-2】：錠剤の製造

本発明のクエルセチン、その誘導体及び薬学的に許容されるその塩を有効成分として含有する錠剤を次のような方法で製造した：クエルセチンのフラボノイド誘導体・塩酸塩 250 g をラクトース 175.9 g 、芋澱粉 180 g 及びコロイド性硅酸 32 g と混合し、10% (w/v) ゼラチン溶液を添加させた後、粉碎して 14 メッシュ体を通過させた後乾燥させ、芋澱粉 160 g 、滑石 50 g 及びステアリン酸マグネシウム 5 g を添加して得た混合物を錠剤に製造した。前記錠剤の成分は次の通りである：

20

クエルセチンのフラボノイド誘導体・塩酸塩	250 g
ラクトース	175.9 g
芋澱粉	180 g
コロイド性硅酸	32 g
10% ゼラチン溶液	適量
芋澱粉	160 g
滑石	50 g
ステアリン酸マグネシウム	5 g

【実施例 4-3】：注射剤の製造

クエルセチンのフラボノイド誘導体・塩酸塩 1 g 、塩化ナトリウム 0.6 g 及びアスコルビン酸 0.1 g を蒸溜水に溶解させ 100 ml の溶液を製造し、これを瓶にいれた後、100℃で 30 分間加熱して滅菌させ、注射剤を製造した。前記注射剤の成分は次の通りである：

30

クエルセチンのフラボノイド誘導体・塩酸塩	1 g
塩化ナトリウム	0.6 g
アスコルビン酸	0.1 g
蒸溜水	適量

産業上の利用可能性

以上述べた通り、本発明は骨芽細胞 (osteoblast) の細胞増殖促進効果及び破骨細胞 (osteoclast) の細胞増殖抑制効果に優れたクエルセチン誘導体を有効成分として含有する骨粗鬆症治療剤を提供する。本発明のクエルセチン誘導体は従来の骨粗鬆症治療剤に比べて骨芽細胞の細胞増殖促進効果及び破骨細胞の細胞増殖抑制効果に優れ、体内ホルモンの変化を誘発せず海綿骨の面積増加効果がさらに高く現れるのみならず、副作用がなく造血機能や免疫系に影響を与えない安全な薬物として確認され、骨粗鬆症治療剤に幅広く活用されうる。

40

以上本発明の特定部分を詳述したところ、当業界の通常の知識を持つ者にとって、このような具体的な記述はただ望ましい実施態様に過ぎず、これにより本発明の範囲が制限されることではない点は明らかである。従って、本発明の実質的な範囲は添付した請求項とそれらの等価物により定義される。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 March 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/17909 A1(21) International Patent Classification: **A61K 31/353** (74) Agent: LEE, Han-Yeong, 8th Fl., Samsoo Bldg., 1675-1 Seocho-dong, Seocho-gu, Seoul 137-070 (KR).

(22) International Application Number: PCT/KR01/000368

(23) International Filing Date: 9 March 2001 (09.03.2001) (81) Designated States (countries): AH, AL, AM, AI, AU, AZ, BA, BY, BG, BR, BY, CZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DR, DM, DZ, EB, ES, FI, GB, GD, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KE, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NL, PL, PT, RO, SL, SI, SK, SI, TA, TM, TR, TT, TZ, UA, HG, US, TZ, VN, YU, ZA, ZW.

(24) Filing Language: Korean

(25) Publication Language: English

(30) Priority Date: 14 August 2000 (14.08.2000) KR 20024916

(71) Applicant (for all designated States except US): KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE (KR/KR); 4th Fl., Seohwa Bldg., 129-11 Cheongdam-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-765 (KR).

(72) Inventors and
(73) Inventors/Applicants (for US only): KIM, Chang-sook (KU/KR), 4th Fl., Cheongam Bldg., 129-11 Cheongdam-dong, Gangnam-gu, 135-100 Seoul (KR), HA, Hye-Kyung (KR/KR); 1-408 Seoul Garden Apartment, Dobong 1-dong, Dobong-gu, Seoul 152-017 (KR). BONG, Kye-Yong (KR/KR); 972-4 Banghwa-dong, Seocho-gu, Seoul 137-061 (KR).

(84) Designated States (regions): ARPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, H, IT, FR, GD, GR, IJ, IL, LU, MC, NL, PL, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NR, SN, TD, TG).

Published:
with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidelines Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/17909 A1

(54) Title: A THERAPEUTIC AGENT OF OSTEOFOROSIS COMPRISING AN ACTIVE INGREDIENT OF QUERCETIN DERIVATIVES

(57) Abstract: The present invention relates to a therapeutic agent of osteoporosis which comprises an active ingredient of quercetin derivatives. The quercetin derivatives of the invention can be genetically applied for the treatment and prevention of osteoporosis, since they effectively inhibit osteoclast proliferation and stimulate osteoblast proliferation more than prior art therapeutic agents of osteoporosis, and increase trabecular bone area highly without changing hormone level in body and toward effects on hematopoietic function and immune system.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

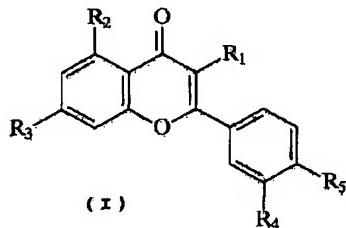
1

A THERAPEUTIC AGENT OF OSTEOPOROSIS COMPRISING AN ACTIVE INGREDIENT OF QUERCETIN DERIVATIVES

6 BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

The present invention relates to a therapeutic agent for osteoporosis which comprises an active ingredient of quercetin derivatives, more specifically, to a therapeutic agent for osteoporosis comprising an active ingredient of quercetin derivatives represented by the following general formula(I) which effectively stimulate osteoblast proliferation and inhibit osteoclast proliferation.



20

Description of the Prior Art

Osteoporosis is a disease characterized by the decrease of bone mass caused by mineral loss and the subsequent expansion of marrow cavity. Bones become brittle with the progress of the disease, and may be easily

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

2

- fractured by a weak impact. Bone mass is affected by various factors such as genetic factors, nutritive condition, changes of hormone level, exercise and life style, and osteoporosis is known to be caused by aging, 5. lack of exercise, low body weight, smoking, low calcium diet, menopause, and ovariectomy. In women, decrease of bone mass begins at the age of 30, and around menopause, concentration of estrogen rapidly decreases and vast amount of B-lymphocytes are accumulated by the similar mechanism 10 to that of B-lymphocyte accumulation by IL-7(interleukin-7), and subsequent pre-B cell accumulation results in increased level of IL-6 which activates osteoclasts, thus, bone mass becomes decreased. In aged people, especially in women of postmenopause, osteoporosis is not the avoidable disease 15 although the severity of the symptom may vary, therefore, many research groups and pharmaceutical companies have made a great deal of efforts for development of therapeutic agents for bone diseases to prevent and treat osteoporosis upon an increase of elderly population.
- 20 Therapeutic agents for osteoporosis now being used include estrogen preparations, androgenic anabolic steroid preparations, calcium supplements, phosphate preparations, fluoride preparations, ipriflavone, vitamin D3, etc. In recent years, novel drugs for osteoporosis have been 25 developed, which include Arimidobisphosphonate by Merck Co. (U.S.A.) in 1995 and Raloxifene which plays a role of selective estrogen receptor modulator(SERM) by Eli Lilly Co. (U.S.A.) in 1997.
- Therapeutic agents for osteoporosis mentioned above 30 are mostly estrogen substances which are known to cause adverse side effects such as cancer, cholelithiasis, and thrombosis. Since long term administration of drug is inevitable in the treatment of osteoporosis, there is a continuing need to develop novel effective agents which can 35 replace estrogen with high safety even when administered for a prolonged period of time.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

9

As estrogen substitutes, phytoestrogens such as soybean isoflavone have been reported. Phytoestrogen, first reported in 1946, was found interim of verifying the cause of clover disease, which was named for the high 5 increase (over 30%) of infertility of the sheep fed with red clover (*Trifolium subterraneum* var. Dyalganup). The cause of clover disease turned out to be an estrogen-like isoflavanoid contained in the plant, hence, the compound obtained from the plant has been named 'phytoestrogen'.
10 After that, compounds reported as phytoestrogen includes isoflavone compounds such as daidzein, genistein, formononetin, and biochanin A, coumestan compounds such as coumestrol, lignan compounds such as enterolactone, and phenol compounds such as enterodiol. Such phytoestrogens
15 exist mostly in the form of aglycone, 6'-O-acetylglucoside or 6'-O-malonylglycoside, and daidzin and genistein exist in the form of 7-O-glucoside. Among aforementioned compounds, glucosides are known to be hydrolysed with enterobacteria or gastric acid and absorbed in the form of
20 aglycone which is a free isoflavone. The researches have revealed that the said phytoestrogens function similarly to the animal estrogens. That is, the phytoestrogen inhibit proliferation of breast cancer cells by binding to the estrogen receptor and have been reported to be used as the
25 estrogen substitute for the treatment of cardiovascular diseases and other symptoms occurring in the postmenopause women. However, the said phytoestrogens are not widely used for the treatment and prevention of osteoporosis due to the insufficient pharmaceutical effectiveness and high
30 cost required for the isolation and purification from natural products.

Under the circumstances, are strong reasons for developing and exploring alternative compounds with safety and effectiveness for the treatment and prevention of
35 osteoporosis, which can be prepared in an economical manner.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

4

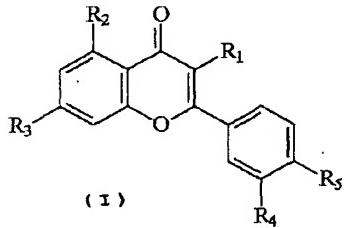
SUMMARY OF THE INVENTION

The present inventors have made an effort to develop an effective substitute agent for the treatment and prevention of osteoporosis, which is safe and economical, and have found that chemically synthesized quercetin derivatives have activities of stimulating osteoblast proliferation and inhibiting osteoclast proliferation, without any adverse side effects on internal organs, thus, 10 quercetin derivative can be employed as an active ingredient of a therapeutic agent for osteoporosis.

A primary object of the present invention is, therefore, to provide a therapeutic agent for osteoporosis 15 which comprises an active ingredient of quercetin derivatives.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

20 The present invention provides a therapeutic agent for osteoporosis which comprises an active ingredient of quercetin derivatives represented by the following general formula(I) and pharmaceutically acceptable carriers:



25 wherein,

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

5

R₁ is gentiotriose, glucopyranose, O-arabinofuranose, O-diglucopyranose; O-galactopyranose, O-galactoside-gallate, O-gentiobiose, O-glucopyranose, O-glucuronide, O-neohesperidose, O-rhamnopyranose, O-rutinose, 5 O-sophorose, O-xylopyranose, OCH₃, OH, rhamnogentiobiose, rhamnoglucose or sulfate;
R₂ is OH or O-glucopyranose;
R₃ is OCH₃, OH, O-glucopyranose, O-glucuronopyranose or glucopyranose;
10 R₄ is OCH₃ or OH; and,
R₅ is OCH₃, OH, O-glucopyranose or O-glucose.

Among the quercetin derivatives represented by general formula(I), well-known compounds are classified as follows: (i) a derivative group of the formula I wherein R₂ to R₅ are OH and R₁ varies, includes quercetin where R₁ is OH, avicularoside where R₁ is O- α -L-arabinofuranose, guiajaverin where R₁ is O-arabinopyranose, hyperoside where R₁ is O- β -D-galactopyranose, isohyperoside where R₁ is O- β -D-galactopyranose, isoquercitrin where R₁ is O-glucopyranose, multinoside A where R₁ is O-[β -D-glucopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranose], multinoside A acetate where R₁ is (6-O-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranose, quercitrin where R₁ is O- α -L-rhamnopyranose, rutin where R₁ is O- β -D-rutinose, quercetin-3-O-(2"-O- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranoside where R₁ is O-(2"-O- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranose, quercetin-3-O-(6"-O-galloyl)-glucopyranose where R₁ is O-(6"-O-galloyl)-glucopyranose, 20 quercetin-3-O-(6'"-O-p-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl-(1-2)- α -L-rhamnopyranoside) where R₁ is O-(6'"-O-p-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl-(1-2)- α -L-rhamnopyranose, quercetin-3-O-D-glucopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranoside where R₁ is O-D-glucopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranose, quercetin-3-O-(2"-O-6'"-O-p-(7"-O- β -D-glucopyranosyl)coumaroyl- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranoside where R₁ is O-(2"-O-

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

6

6'”-O-p-(7’’”-O- β -D-glucopyranosyl)coumaroyl- β -D-glucopyranosyl]- α -L-rhamnopyranose, quercetin-3-O-[6'”-p-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl- β -(1-4)-rhamnopyranoside] where R₁ is O-[6'”-p-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl- β -(1-4)-rhamnopyranose], quercetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl(1-2)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranoside] where R₁ is O-[α -L-rhamnopyranosyl(1-2)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranoside], quercetin-3-O-[α -rhamnopyranosyl(1-4) α -L-rhamnopyranosyl(1-6) β -D-galactopyranoside] where R₁ is O-[α -rhamnopyranosyl(1-4) α -L-rhamnopyranosyl(1-6) β -D-galactopyranose], quercetin-3-O-[α -rhamnopyranosyl-(1-2)]-[β -D-galactopyranosyl-(1-6)]- β -D-galactopyranoside where R₁ is O-[α -rhamnopyranosyl-(1-2)]-[β -D-galactopyranosyl-(1-6)]- β -D-galactopyranose, quercetin-3-O-[α -rhamnopyranosyl-(1-4)- α -rhamnopyranosyl-(1-6)- β -galactopyranoside] where R₁ is O-[α -rhamnopyranosyl-(1-4)- α -rhamnopyranosyl-(1-6)- β -galactopyranose], quercetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-galactopyranoside where R₁ is O- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-galactopyranose, quercetin-3-O- β -D-diglucopyranoside where R₁ is O- β -D-diglucopyranose, quercetin-3-O- β -D-galactoside-2"-gallate where R₁ is O- β -D-galactoside-2"-gallate, quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside-(1-6)- β -D-galactopyranose, quercetin-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1-3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-galactopyranose, quercetin-3-O- β -D-glucuronide, quercetin-3-O- β -D-xylopyranoside where R₁ is O- β -D-glucopyranosyl-(1-3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-galactopyranose, quercetin-3-O- β -D-glucuronide where R₁ is O- β -D-glucuronide, quercetin-3-O- β -D-xylopyranoside where R₁ is O- β -D-xylopyranose, quercetin-3-O-diglucopyranoside where R₁ is O-diglucopyranose, quercetin-3-O-gentioside where R₁ is O-gentioside, quercetin-3-O-glucopyranosylgalactopyranoside where R₁ is O-glucopyranosylgalactopyranose, quercetin-3-O-neohesperidoside where R₁ is O-neohesperidose, quercetin-3-O-sophoroside where R₁ is O-sophorose, quercetin-3-gentiotriose where R₁ is gentiotriose, quercetin-3-methyl ether where R₁ is OCH₃, quercetin-3-rhamnogentioside.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

7

where R_1 is rhamnogentioibiose, quercetin-3-rhamnoglucoside where R_1 is sulfate; (ii) a derivative group of the formula I wherein R_1 is -OH, three functional groups out of R_2 to R_5 are -OH, and the rest one functional group varies, includes isorhamnetin where R_1 is OCH₃, quercimeritrin where R_1 is O- β -D-glucopyranose, rhamnetin where R_1 is OCH₃, quercetin-5-O- β -D-glucopyranoside where R_2 is O- β -D-glucopyranose, quercetin-7-O- β -D-glucuronopyranoside where R_1 is O- β -D-
10 glucurcropyranose, and spireaside where R_1 is O-glucose; (iii) a derivative group of the formula I wherein three functional groups out of R_1 to R_5 are OH and the rest two functional groups vary, includes rhamnazin where R_1 and R_4 are OCH₃, quercetin-3',4'-dimethyl ether where R_4 and R_5 are OCH₃, quercetin-3,3'-dimethyl ether where R_1 and R_4 are OCH₃, quercetin-3,7-dimethyl ether where R_1 and R_3 are OCH₃, quercetin-3-O-[2"-O-(6"-O-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl]- α -L-rhamnopyranosyl-7-O- β -D-glucopyranoside where R_1 is O-[2"-O-(6"-O-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl]- α -L-
20 rhamnopyranose and R_3 is O- β -D-glucopyranose, quercetin-3-O-[2"-O-6'"-O-p-(7""-O-p-(7""-O- β -D-glucopyranosyl)coumaroyl- β -D-glucopyranosyl]- α -L-rhamnopyranoside-7-O- β -D-glucopyranoside where R_1 is O-[2"-O-6'"-O-p-(7""-O- β -D-glucopyranosyl)coumaroyl- β -D-glucopyranosyl]- α -L-
25 rhamnopyranose and R_3 is O- β -D-glucopyranose, quercetin-3-O-rutinoside-7-O-3-D-glucopyranoside where R_1 is O-rutinose and R_3 is O- β -D-glucopyranose, quercetin-3-O- α -L-arabinopyranosyl-7-O-3-D-glucopyranoside where R_1 is O- α -L-arabinopyranosyl and R_3 is O-3-D-glucopyranose, quercetin-7-O- β -D-glucopyranoside-3-O-sophorose where R_1 is O-sophorose and R_3 is O- β -D-glucopyranose, quercetin-3-O-galactopyranosyl-7-O-diglucopyranoside where R_1 is O-galactopyranose and R_3 is O-glucopyranose, quercetin-3-O-glucopyranosyl-7-diglucopyranoside where R_1 is O-glucopyranose and R_3 is O-glucopyranose, quercetin-3,7-diglucopyranoside where R_1 is glucopyranose and R_3 is glucopyranose, quercetin-3-gentibiosyl-7-glucopyranoside
30
35

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

8

where R₁ is gentiobiose and R₃ is glucopyranose, and quercetin-3,4'-di-O- β -D-glucopyranoside where R₁ and R₂ are O- β -D-glucopyranose; and (iv) a derivative group of the formula I wherein more than three functional groups vary, 5 includes quercetin-3,4',7-trimethyl ether where R₁, R₃ and R₄ are OCH₃, and R₂ and R₅ are OH, and quercetin-3,3',4',7-tetramethyl ether where R₁, R₃, R₄ and R₅ are OCH₃, and R₂ is OH.

10 Quercetin having same OH groups in R₁ to R₅ of the above general formula(I) is a phenolic compound found in over 4000 kinds of plants in nature and is known as one of the phytoestrogens. It has a molecular formula of C₁₅H₁₀O₇ with resonance structures and a molecular weight of 302.33 g/mole and also known as vitamin P following the chemical structure identification in 1936. Quercetin is a rutin, a glycoside wherein sugar is linked via β -linkage and widely distributed in plants such as clover flower, pollen of common ragweed, and shell and stem of various plants, as well as in onion, kale, broccoli, lettuce, tomato, and apple. Quercetin has been verified not only to play an important role in maintenance of capillary wall integrity and capillary resistance(see: Gabor et al., *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular, and Medical Properties*, 280: 1-15, 1988; Havsteen et al., *Biochemical Pharmacology*, 32:1141-1148, 1983) but also to have antioxidant activity, vitamin P activity, ultraviolet absorbing activity, antihypertensive activity, antiarrhythmic activity, antiinflammatory activity, 20 antiallergic activity, anticholesteremic activity, suppressive activity on liver toxicity, and therapeutic effect on infertility, thus, it may be expected to use quercetin widely in foods, medical and pharmaceutical products, and cosmetics. However, there has been no report 25 on the use of quercetin for prevention and treatment of osteoporosis.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

9

The therapeutic agent for osteoporosis of the invention comprising an active ingredient of quercetin derivative is illustrated below.

5 In order to search for the effects of quercetin derivatives on proliferation of osteoblasts and osteoclasts, the present inventors compared the effect of quercetin with that of phytoestrogen genistein which is known to be an effective agent for treatment of osteoporosis, and have
10 found that quercetin has superior effects to genistein for activation of osteoblast proliferation, increase of alkaline phosphatase activity, and inhibition of osteoclast proliferation.

15 Furthermore, in ovariectomized rats, administration of quercetin derivatives has been found not to bring about changes in hormone level, proving that quercetin is a safe agent not causing uterine hypertrophy, an adverse side effect of estradiol which is being used as a therapeutic
20 agent for osteoporosis currently. Also, quercetin derivatives were shown to be more effective than estradiol on increase of trabecular bone area of tibia which is apt to drastic change in trabecular bone area, and to have no adverse effect on hematopoietic function and immune system.

25 Therefore, quercetin derivatives of the invention, based on above results, have been found not only to have superior effects to currently using phytoestrogen genistein for activation of osteoblast proliferation and inhibition
30 of osteoclast proliferation but also to have little side effects, bring about little change in hormone level and have no adverse effect on hematopoietic function and immune system, substantiating the use of quercetin derivatives as a therapeutic or preventive agent for osteoporosis.

35

Formulation

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

10

The said quercetin derivatives having superior effect on treatment of osteoporosis may be mixed with pharmaceutically acceptable excipients including binders such as polyvinylpyrrolidone, hydroxypropylcellulose, etc., 5 disintegrating agents such as calcium carboxymethylcellulose, sodium glycolate starch, etc., diluting agents such as corn starch, lactose, soybean oil, crystalline cellulose, mannitol, etc., lubricating agents such as magnesium stearate, talc, etc., sweeteners such as 10 sucrose, fructose, sorbitol, aspartame, etc., stabilizing agents such as sodium carboxymethylcellulose, α - or β -cyclodextrin, vitamin C, citric acid, white wax, etc, preservatives such as paraoxymethylbenzoate, paraoxypyropylbenzoate, sodium benzoate, etc., and aromatics 15 such as ethylvanillin, masking flavor, flavonomenthol, herb flavor, etc. to prepare pharmaceutical formulations for oral or parenteral administration such as tablets, capsules, soft capsules, liquids, ointments, pills, powders, suspensions, emulsions, syrups, suppositories or injections.

20 Also, to augment efficacy of prevention and treatment of osteoporosis, calcium or vitamin D₃ may be added to the formulations. For parenteral administration of the pharmaceutical preparation of the invention, subcutaneous, intravenous, intramuscular or intraperitoneal injection may 25 be employed. For parenteral administration, quercetin derivative may be mixed with stabilizer or buffer in water to prepare solution or suspension which can be produced as single-dose formulations of ampule or vial.

30 Dosage

The effective amount of quercetin in the therapeutic agent for osteoporosis of the invention is 2 to 20mg/kg, preferably 8 to 12mg/kg, which may be administered to the patient more than once a day depending on the patient's age, 35 gender, degree of seriousness, way of administration, or purpose of prevention.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

Safety

The toxicity of the quercetin derivatives of the invention has been reported in the literature (see: M. Sullivan et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 77:269, 1951) for the cases of oral administration and intraperitoneal administration to the mice, and LD₅₀ of orally administered quercetin was not less than 160mg/kg, approving that quercetin is safe. In the present invention, liver, kidney, brain, uterus, skin and tibia were examined for the side effect of quercetin, which revealed that the weight of liver, kidney, brain, skin and tibia was not affected, moreover, uterine hypertrophy, a side effect of currently used therapeutic agents, was not observed with quercetin, proving that quercetin derivative as a hormone preparation can be used safely as a therapeutic agent for osteoporosis.

The present invention is further illustrated in the following examples, which should not be taken to limit the scope of the invention.

Example 1: Effect of quercetin on osteoblast proliferation

To analyse the effect of quercetin on osteoblast proliferation, human osteoblast-like cell line Saos-2 was employed and a phytoestrogen genistein was employed as a comparative agent which has been intensively studied as a therapeutic agent for osteoporosis.

Example 1-1: Selection and culture of osteoblasts

Saos-2 cell line which has similar properties to osteoblasts was obtained from Korean Cell Line Bank affiliated to the Cancer Research Institute of School of Medicine, Seoul National University.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

12

Saos-2 cells were seeded in a RPMI 1640 medium(Gibco BRL, U.S.A.) supplemented with 10%(v/v) FBS, 100unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and grown to form a monolayer in an incubator at 37°C under an environment of 5%(v/v) CO₂ and saturated humidity. The culture was fed with fresh medium 2 to 3 times a week and subcultured once a week using 0.25%(w/v) trypsin.

10 Example 1-2: Cell proliferation depending on concentrations of the agents

Saos-2 cells were distributed into a 96-well plate(20,000 cells/well) and quercetin in 1% DMSO was added to a final concentration of 10⁻² to 10⁻⁹mg/ml, 6 wells per each concentration. As a control group, cells without quercetin were used, and as a comparative group, the cells treated with various concentrations of genistein, being studied as a therapeutic agent for osteoporosis, were used. Cells were grown in an incubator at 37°C for 3 days and incubated 4 more hours under the same condition after adding MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Triazolyl Blue) to a concentration of 0.05mg/ml. Then, purple colored formazan formed in proportion to the number of viable cells was dissolved in DMSO and measured OD at 550nm employing ELISA reader.

Cell proliferation rate(t) was evaluated by calculating the ratio of the OD of quercetin added well to the OD of control well, wherein, average value of ODs from 6 wells treated with the same concentration of quercetin was employed(see: Table 1).

35 cell proliferation rate(t) = {(average value of OD at 550nm of quercetin-treated wells - average value of OD at 550nm

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

13

of empty wells)/average value of OD at 550nm of control wells;X100

Example 1-3: Analysis of alkaline phosphatase(ALP) activity

Since osteoblasts have cell specific alkaline phosphatase activity, the effect of quercetin of the invention on ALP activity in osteoblasts was evaluated as follows: the number of cells, concentration of tested agent, and culture condition were same as those used in MTT experiment of Example 1-2, and cells were harvested after 3 day-incubation. Genistein was used as a comparative agent. ALP activity was evaluated by analysing changes of OD at 405nm result from hydrolysis of p-nitrophenylphosphate to p-nitrophenol and phosphate(see: Table 1).

Table 1: Effect of quercetin on osteoblast proliferation

Concent ration (mg/ml)	Quercetin (% of control group)		Genistein (% of control group)	
	MTT assay	ALP activity	MTT assay	ALP activity
Control group	100.0 ±2.5	100.0 ±1.6	100.0 ±0.6	100.0 ±7.3
1 ×10 ⁻⁵	93.1 ±0.8*	98.1 ±0.0	91.3 ±0.6*	106.1 ±6.4
1 ×10 ⁻⁶	93.9 ±0.8	104.4 ±3.9	96.9 ±2.7	101.5 ±8.8
1 ×10 ⁻⁷	98.6 ±1.0	101.2 ±3.1	95.9 ±1.6	109.3 ±9.6
1 ×10 ⁻⁸	96.0 ±1.0	127.2 ±3.5**	90.5 ±0.9**	103.8 ±8.7
1 ×10 ⁻⁹	95.8 ±1.1	116.5 ±5.7	97.3 ±1.6	113.5 ±7.3
1 ×10 ⁻⁴	96.5 ±0.8	113.5 ±2.3	95.7 ±0.7	121.1 ±6.2
1 ×10 ⁻³	98.3 ±0.8	107.3 ±1.5	85.5 ±1.1**	98.8 ±6.9
1 ×10 ⁻²	108.6 ±2.2**	106.1 ±4.3	66.2 ±2.8**	62.3 ±3.4

20 *: p<0.05

**: p<0.01

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

14

As shown in Table 1 above, in the cell proliferation experiment using MTT method, the cells treated with various concentrations of quercetin in the range of 1×10^{-9} to 1×10^{-3} mg/ml did not show any difference from the control cells which were not treated with the agent, while quercetin showed maximum cell proliferation effect of 109% of control cell proliferation at a concentration of 1×10^{-2} mg/ml ($p < 0.01$). On the other hand, genistein, a comparative agent, showed 91% ($p < 0.05$) at a concentration of 1×10^{-9} mg/ml, 90.5% ($p < 0.01$) at a concentration of 1×10^{-6} mg/ml, 86% ($p < 0.01$) at a concentration of 1×10^{-3} mg/ml, and 66% ($p < 0.01$) at a concentration of 1×10^{-2} mg/ml, implying that genistein exert rather inhibitory effect than stimulatory effect on proliferation of osteoblasts.

In the experiment of assaying ALP activity, quercetin showed its maximum ALP activation effect of 127% ($p < 0.01$) of control ALP activity at a concentration of 1×10^{-6} mg/ml, while genistein showed its maximum ALP activation activity of 121% at a concentration of 1×10^{-9} mg/ml, indicating that the ALP activation effect of quercetin of the invention is about 100 fold higher than that of genistein. Therefore, quercetin of the invention is more effective on the stimulation of osteoblast proliferation and activation of ALP activity than genistein which is studied intensively as a therapeutic agent for osteoporosis in recent years.

Example 2: Effect of quercetin on osteoclast proliferation

To examine whether quercetin have inhibitory effect on the proliferation of osteoclasts, experiments were carried out as followings.

35 Example 2-1: Selection and culture of osteoclasts

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

15

ICR mice(Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon, Korea) were fed with calcium deficient diet(ICN Biomedicals, Inc., Ohio, U.S.A.) for 4 weeks to activate osteoclasts. The right and left tibiae and femurs 5 of the calcium deficient rats were removed avoiding contamination of surrounding muscle tissues. Femurs and right and left tibiae, classified on the clean bench and kept on ice separately, were added into the α-MEM containing 100 µg/ml streptomycin and then vigorously 10 shaken respectively to extract osteoclasts into the medium. After kept on ice for 5 minutes, the cell suspension was centrifuged at 800xg for 3 minutes and the cell pellet was resuspended in a α-MEM nutrient medium supplemented with 10% FBS, 100 µg/ml streptomycin and 100unit/ml penicillin. 15 The cell suspension was distributed into wells of a 24-well plate at a cell number of 3.5×10^6 /well.

Example 2-2: Cell proliferation depending on concentrations of quercetin

To the osteoclasts obtained in Example 2-1 above, 20 quercetin was added to yield concentrations of 1×10^{-9} to 1×10^{-2} mg/ml. On day 2, the cells were subjected to tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) staining using a 25 commercially available kit(Sigma Chemical Co., U.S.A.), followed by counting of osteoclasts which are TRAP-positive multinucleated cells(MNC), judged by more than three nuclei in a cell stained red(see: Table 2).

80 Table 2: Effect of quercetin on osteoclast proliferation

Concentration (mg/ml)	Number of osteoclast (% of control group)
Control group	100.0±8.1
1×10^{-4}	100.9±1.8
1×10^{-6}	96.8±2.7
1×10^{-8}	89.6±3.2

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

16

1×10^{-3}	61.1±4.1*
1×10^{-2}	24.7±5.7**

*: p<0.05,

**: p<0.01

As shown in Table 2 above, while quercetin at concentrations between 1×10^{-6} to 1×10^{-4} mg/ml exerted little inhibitory effect on the osteoclast proliferation, the cell numbers at quercetin concentration of 1×10^{-3} mg/ml and 1×10^{-2} mg/ml was 61%(p<0.05%) and 25% of control cell number respectively, showing that quercetin exerted remarkable inhibitory effect on the osteoclast proliferation.

Based on the results of Examples 1 and 2, it was clearly demonstrated that quercetin is a potential therapeutic agent for osteoporosis which exerts stimulatory effect on osteoblast proliferation and inhibitory effect on osteoclast proliferation at a concentration of 10^{-2} mg/ml.

Example 3: Effect of quercetin on ovariectomized rats

Female SD(Sprague-Dawley) rats, a model animal for type I' osteoporosis occurring after menopause were employed for evaluating pharmacological effectiveness of quercetin. Female rats(10 weeks old) weighing 200 to 300g, obtained from the Korea Research Institute of Chemical Technology were employed as experimental animals. Experiment was carried out by the procedure which comprises removing ovary, administration of agents to the each group of rats, and at certain days after ovariectomy, the rats were sacrificed and subjected to analyses including measurement of body weight, examination of internal organs, measurement of trabecular bone area, complete blood count, and biochemical analyses of plasma.

Example 3-1: Ovariectomy and administration of the agents

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

17

Rats of control group and test group, except Sham group(normal group), were ovariectomized as follows: a female rat was systemic anesthetized by intramuscular injection with 5mg/100g Ketamin(Yuhan Corporation, Korea) and 1mg/100g Xylazine(Beyer Korea, Korea) to the femur muscle of left and right hind limbs, and then, fur of lower abdominal region was shaved, operation area was sterilized with Potadin liquid(Iodine, Samil Pharm. Co., Ltd., Korea) in lying position, about 2cm of abdominal skin, abdominal muscle, and peritoneum was cut in the middle under aseptic condition, ovary was exposed using sterilized forceps, followed by removal of both left and right ovaries after ligaturing of oviducts using silk threads. Subsequently, 0.3ml of antibiotics(Sulfaforte®-4, Yoonhee Chemical Co., Ltd., Korea) was injected intraperitoneally to prevent infection, and then peritoneum, abdominal muscle and skin were sutured with silk threads or nylon threads.

The Sham group, animals operated upon for the surgery as in the ovariectomized rats except for removing ovary, were employed to compare the changes caused solely by ovariectomy in control group which were ovariectomized but no agent was administered. Control group was employed to compare the changes caused by administration of agents in test group which were ovariectomized and administered with testing agents.

When test agents were administered, for a certain period of time before and after administration, 1.5ml of blood was sampled from tail vein using a catheter(B.D Co.: 24G) and subjected to complete blood count(Coulter Co.: JT) and biochemical analyses of plasma(Crone Co.: Airon® 200). During autopsy, blood was sampled from caudal venae cavae and subjected to the analyses above. And then, each sample was frozen to store for measurement of trabecular bone area of femur and examination of internal organs.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

One week after operation, rats in Sham group and control group were intraperitoneally injected with 10% Tween 80 solution, the rats in E2 group were injected with 17 β -estradiol at a concentration of 1 μ g/kg/day, the rats in test group were injected with quercetin or genistein at a concentration of 10mg/kg/day for 9 weeks, and the rats in each group were subjected to body weight measurement once a week. During the period of administration, blood was sampled once a week. After 9-week administration, entire blood was withdrawn with heparin treatment. Following complete blood count(CBC), the blood was centrifuged at 3,000rpm for 20 minutes to obtain plasma which was stored at -70°C until use. For measurement of bone mineral density, the lumbar spine L5 and L6, and right tibia were removed and stored separately in 4% (v/v) formalin solution.

Example 3-2: Body weight change depending on quercetin administration

The body weight of the rats in Sham group, E2 group treated with 17 β -estradiol and test group treated with quercetin or genistein respectively, was measured once a week for 10 weeks after operation(see: Table 3).

Table 3: Measurement of body weight changes depending on drug administration

Time (week)	Weight(g)				
	Control group	Sham group	E2-treated group	Quercetin- treated group	Genistein- treated group
Before operat ion	219.39 \pm 4. .05	220.70 \pm 4.6 3	228.31 \pm 8.1 1	221.87 \pm 7. 57	217.55 \pm 7.2 4
1 after operat ion	244.98 \pm 3. .00	231.51 \pm 4.6 8	249.50 \pm 8.1 6	241.73 \pm 4. 83	242.12 \pm 5.9 6

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

19

2 after operat ion	274.29±3 .68**	236.40±5.0 6**	264.97±8.3 5	271.70±5. 79**	270.00±8.0 5**
3 after operat ion	299.37±3 .74**	245.56±4.7 9**	279.87±8.1 5**	295.00±3. 89**	296.20±7.6 8**
4 after operat ion	315.20±3 .84**	248.96±5.0 2**	292.83±9.2 5**	312.07±5. 95**	310.80±7.8 0**
5 after operat ion	320.30±4 .03**	255.43±5.1 4**	296.96±9.4 4**	320.25±6. 76**	317.29±7.9 3**
6 after operat ion	329.03±5 .05**	261.48±6.4 6**	304.49±8.4 0**	326.68±6. 73**	327.19±8.3 1**
7 after operat ion	337.39±5 .93**	264.78±5.5 3**	313.04±8.7 3**	333.25±7. 61**	332.80±9.2 3**
8 after operat ion	340.01±6 .60**	268.16±5.4 0**	315.87±8.3 2**	335.09±6. 65**	336.38±9.0 1**
9 after operat ion	347.96±7 .58**	273.81±4.5 4**	319.95±9.4 7**	343.02±6. 96**	342.71±8.2 6**
10 after operat ion	356.73±7 .13**	275.22±4.3 0**	320.00±5.9 0**	346.27±6. 39**	347.23±7.5 7**

*: p<0.05, **: p<0.01, compared with before operation

#: p<0.05, #: p<0.01, compared with control group

As shown in Table 3, body weight of Sham group began to increase 3 weeks(p<0.05) after operation and that of control group began to increase 2 weeks(p<0.01) after operation. That is, control group showed rapid increase of body weight compare to Sham group, and such increase of body weight was slowed down after administration of estradiol, and E2 group showed slower increase of body

5 to increase 3 weeks(p<0.05) after operation and that of control group began to increase 2 weeks(p<0.01) after operation. That is, control group showed rapid increase of body weight compare to Sham group, and such increase of body weight was slowed down after administration of

10 estradiol, and E2 group showed slower increase of body

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

20

weight compare to control group($p<0.05$) 20 weeks after operation. Meanwhile, the test group administered with phytoestrogen quercetin or genistein at a concentration of 10mg/kg/day respectively showed rapid increase of body weight even after removing ovary similar to control group. Thus, quercetin administration was found not to bring about meaningful changes in hormone level in the body.

Example 3-3: Changes in the weight of internal organ by quercetin.

To find out quercetin effect on internal organ of test animal, liver, kidney, brain, uterus, skin, and tibia were removed from the test animals administered with test agents for 9 weeks after operation and wet weight of each organ was measured(see: Table 4).

Table 4: Changes in the weight of internal organ after drug administration

20

	Control group	Sham group	E2-treated group	Quercetin-treated group	Genistein-treated group
Liver (g)	9.84±0.3 3	9.52±0. 48	9.22±0.4 3	9.07±0.30	10.03±0.36
Kidney (g)	1.95±0.0 9	1.91±0. 05	1.85±0.0 9	1.84±0.05	1.83±0.03
Brain (g)	2.03±0.0 4	1.93±0. 02	1.98±0.0 5	1.98±0.04	1.98±0.03
Tibia (g)	0.559±0. 025	0.514±0. .013	0.504±0. 019	0.554±0.01 9	0.537±0.00 8
Skin (mg)	193±7	169±8	193±6	197±11	188±9
Uterus (mg)	79±4	450±29**	279±10**	85±6	106±3

**: $p<0.01$

As shown in Table 4, in case of the weight of liver, kidney, brain, tibia, and skin, normal Sham group, 25 ovariectomized control group and test group did not show

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

21

differences among groups. However, in case of weight of uterus which is affected by the estrogen secreted from ovary, ovariectomized control group showed significant decrease($p<0.01$) compare to Sham group, and administration of E2 after removing ovary suppressed atrophy of uterus($p<0.01$) compare to control group. Administration of phytoestrogen quercetin or genistein did not give rise to change in weight of uterus, on the other hand, E2 which is a currently used therapeutic agent for osteoporosis showed side effect such as uterine hypertrophy, showing that quercetin can be used safely as a therapeutic agent for osteoporosis without adverse side effect.

Example 3-4: Changes in the trabecular bone area by quercetin

Trabecular bone area(TBA) of lumbar and tibia removed from the rats of each group which was treated with various agents for 9 weeks were measured as follows: that is, using a digitalizer of quantitative image analysis system(Wild Leitz Co.), image of each trabecula was obtained on computer monitor by drawing a contour of the trabecula, and then, using a computer, calculated were average areas of trabeculae within a rectangle of $2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ area wherein the width is about 2/3 of the length of growth plate which located underneath of growth plate at proximity of tibia. Also, following the number of trabeculae within the rectangle were obtained, average area was multiplied by the number of trabeculae to obtain trabecular bone area of each sample bone, which was analyzed statistically(see: Table 5).

Table 5: Changes in the trabecular bone area of tibia depending on drug administration

	TBA ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)	Change Rate(%)
Control group	34.62 ± 2.62	100.00 ± 7.55

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

22

Sham group	85.55 ±5.31**	247.07 ±15.33**
E2-treated group	51.40 ±2.28	148.46 ±6.59
Quercetin-treated group	55.52 ±7.68*	160.34 ±22.17*
Genistein-treated group	47.65 ±2.07	137.62 ±5.98

*: p<0.05,

**: p<0.01

As shown in Table 5, in case of tibia, the TBA of control group was $34.62 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ which is a significantly decreased value compare to normal Sham group of $85.55 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ($p<0.01$), showing that osteoporosis have occurred in control group, and such decreased TBA was increased again by treatment with E2, quercetin or genistein to 148%, 160%, 10 and 138% of TBA of control group respectively, especially in case of quercetin, remarkable increase of TBA was monitored($p<0.05$).

TBAs of lumbar removed from the animal treated with test agents for 9 weeks were measured employing the same method above(see: Table 6).

Table 6: Changes in the trabecular bone area of lumbar depending on drug administration

20

	TBA ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)	Change Rate(%)
Control group	67.53 ±2.31	100.00±3.42
Sham group	93.70 ±5.29**	138.76±7.84**
E2-treated group	89.16 ±2.83**	132.04±4.19**
Quercetin-treated group	87.38 ±4.53*	129.40±6.71*
Genistein-treated group	86.58 ±3.00*	128.23±4.45*

*: p<0.05,

**: p<0.01

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

23

As shown in Table 6, in case of lumbar, the TBA of control group was $67.53 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ which is a decreased value compare to Sham group of $93.70 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ($p<0.01$), but, such decreased TBA was increased again by treatment with E2, quercetin or genistein to 132% ($p<0.01$), 129% ($p<0.05$) and 128% ($p<0.05$) of TBA of control group respectively, showing that these test agents exerted suppressing effect on decrease of TBA caused by ovariectomy. Especially, 10 quercetin showed more significant increase of TBA in tibia which is apt to drastic change in TBA than E2 a currently used therapeutic agent for osteoporosis, showing that quercetin is a more effective therapeutic agent not causing uterine hypertrophy which is an adverse side effect caused 15 by E2.

Example 3-5: Complete blood count

Complete blood count which reflects the condition and 20 abnormality of the body was measured to find out abnormality in test animals caused by administration of agents. That is, to find out changes in hematopoiesis of test rats, measured were red blood cell(RBC) count, concentration of hemoglobin(Hb) and hematocrit(Ht) of blood 25 samples obtained from the rats prior to operation and the rats 10 weeks after administrating agents following operation, and to find out changes in immune system such as inflammation and necrosis of tissues, measured were white blood cell count, lymphocyte count, monocyte count, and 30 granulocyte count(see: Table 7).

35

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

24

Table 7: Changes in Complete blood count depending on drug administration

	Operat ion	Control group	Sham group	E2- treated group	Quercetin -treated group	Genistein -treated group
Red blood cell(RBC) count ($\times 10^3$ cells/ μ l)	bef	7.36±0. ore 11	7.19±0. 15.	7.33±0. 13	7.29± 0.15	7.32± 0.13
	aft er	7.08±0. 09	6.75±0. 24	6.97±0. 14	7.13± 0.15	7.17± 0.13
Concentration of hemoglobin(Hb) (g/dl)	bef	16.09±0. ore .21	15.75±0. .20	15.86±0. .24	16.00±0.3 0	15.82±0.2 7
	aft er	14.53±0. .20	14.09±0. .48	14.34±0. .29	14.84±0.2 2*	14.70±0.2 2**
Hematocrit(Ht) (%)	bef	43.34±0. ore .48	43.09±0. .61	43.11±0. .55	43.62±0.8 3	42.76±0.6 5
	aft er	39.48±0. .60	38.39±1. .24	38.86±0. .72	41.10±0.6 8*	40.66±0.5 6*
White blood cell count ($\times 10^3$ cells/ μ l)	bef	26.13±4. ore .63	25.61±3. .64	23.14±1. .55	20.28±3.7 7	27.30±4.8 5
	aft er	21.66±2. .85	12.74±2. .88	13.25±0. .97	18.50±7.6 0	21.50±2.5 3
Lymphocyte count ($\times 10^3$ cells/ μ l)	bef	22.14±4. ore .49	18.04±2. .38	17.80±1. .72	16.78±3.5 2	19.68±4.5 2
	aft er	21.20±5. .00	10.20±2. .88	10.23±0. .96	15.00±7.7 1	15.25±3.2 1
Monocyte count ($\times 10^3$ cells/ μ l)	bef	1.02±0. ore 18	0.73±0. 17	1.44±0. 29	0.65± 0.07	0.77± 0.09
	aft er	1.30±0. 21	0.95±0. 14	1.02±0. 24	1.00± 0.20	0.83± 0.19
Granulocyte count ($\times 10^3$ cells/ μ l)	bef	2.99±0. ore 44	2.83±0. .39	3.67±0. .40	2.80± 0.30	2.23± 0.10
	aft er	2.52±0. 23	1.93±0. .26	1.99±0. .25	2.43± 0.12	2.38± 0.37

*: p<0.05,

**: p<0.01

As shown in Table 7, RBC count did not show any changes before and after operation in all groups, and concentration of hemoglobin and hematocrit were decreased after operation in all groups. White blood cell count did not show any changes before and after operation in quercetin or genistein treated groups, but decreased in Sham group and E2 group after operation. Also, lymphocyte

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

and granulocyte count showed rapid decrease in B2 group only, and monocyte count was stayed same in entire groups. Thus, quercetin was found to be a safe agent not disturbing hematopoiesis and immune system of the body.

5

Example 3-6: Biochemical changes of plasma by quercetin

Since blood reflects the condition of body, safety of quercetin in the body was evaluated by measuring biochemical parameters: that is, blood samples were obtained from the rat prior to operation, one week after operation, and 10 weeks after operation, and measured were levels of alkaline phosphatase(ALP), calcium, inorganic phosphate, blood urea nitrogen(BUN), creatinin, total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol (see: Table 8).

Table 8: Changes in biochemical parameters in plasma depending on drug administration

	Operati on	Control group	Sham group	E2- treated group	Quercetin- treated group	Genistein- treated group
Concen tration of ALP (U/dL)	before	262.75±23 .31	245.59±22 .05	196.01±20 .31	232.83±20 .27	208.05±19. 72
	1 week after	265.75±22 .78	215.18±20 .22	195.24±27 .87	226.67±23 .20	212.10±17. 92
	10 weeks after	199.31±14 .64	135.09±10 .64**	123.99±22 .18	156.42±13 .08	127.14±9.9 5***
	before	10.48±0.4 3	10.57±0.5 5	10.86±0.4 0	10.73±0.4 8	10.61±0.49
Concen tration of calciu m (mg/dL)	1 week after	9.98±0.34	10.35±0.1 7	10.03±0.1 8	8.37±0.24 **	8.97±0.29*
	10 weeks after	10.83±0.1 6	11.79±0.2 3*	11.20±0.1 6*	10.26±0.1 9*	10.44±0.22†
	before	6.52±0.39	6.87±0.62	6.90±0.52	6.79±0.66	7.18±0.48
Concen tration of inorgan ic phospha te (mg/dL)	1 week after	6.27±0.31	6.59±0.20	6.13±0.12	6.21±0.18	6.47±0.16
	10 weeks after	4.95±0.41 **	6.09±0.47	5.51±0.45	5.73±0.58	5.62±0.25†

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

26

Concent ration of blood urea nitrogen (BUN) (mg/dL)	before	10.56 ± 0.9	17.13 ± 1.1	16.36 ± 1.0	17.05 ± 0.6	16.82 ± 0.6
	1 week after	18.31 ± 0.7	16.75 ± 0.5	17.79 ± 0.7	18.06 ± 0.8	18.26 ± 0.94
	10 weeks after	21.20 ± 1.0	19.73 ± 0.8	19.99 ± 0.8	18.19 ± 0.4	18.51 ± 0.86
Concent ration of creatinin in (mg/dL)	before	0.54 ± 0.05	0.56 ± 0.06	0.55 ± 0.05	0.57 ± 0.05	0.51 ± 0.04
	1 week after	0.54 ± 0.05	0.62 ± 0.04	0.57 ± 0.03	0.39 ± 0.01	0.54 ± 0.02
	10 weeks after	0.78 ± 0.03	0.80 ± 0.03	0.81 ± 0.03	0.82 ± 0.04	0.82 ± 0.04
Concent ration of total cholesterol (mg/dL)	before	72.66 ± 5.0	79.67 ± 1.7	76.79 ± 2.8	77.55 ± 5.1	85.51 ± 5.45
	1 week after	93.32 ± 4.7	79.75 ± 2.4	95.53 ± 4.1	85.84 ± 3.8	91.56 ± 3.65
	10 weeks after	$120.44 \pm 5.$	88.60 ± 4.8	$115.05 \pm 5.$	$107.73 \pm 2.$	121.07 ± 6.5
Concent ration of HDL-cholesterol (mg/dL)	before	53.78 ± 2.7	52.33 ± 1.6	52.30 ± 1.0	53.38 ± 3.1	61.12 ± 3.57
	1 week after	46.20 ± 0.6	41.69 ± 1.4	49.03 ± 3.3	42.49 ± 4.8	35.26 ± 1.92
	10 weeks after	29.60 ± 2.6	22.32 ± 2.4	24.94 ± 2.7	25.13 ± 2.7	29.27 ± 1.98
Concent ration of LDL-cholesterol (mg/dL)	before	18.88 ± 3.1	26.63 ± 3.0	24.49 ± 1.6	24.17 ± 3.1	24.39 ± 3.63
	1 week after	42.80 ± 6.4	36.30 ± 0.6	40.50 ± 6.1	40.85 ± 4.8	60.47 ± 7.04
	10 weeks after	90.84 ± 6.2	69.29 ± 3.0	88.33 ± 4.7	82.60 ± 4.8	91.80 ± 6.57

*: p<0.05, **: p<0.01, compared with control group

#: p<0.05, §§: p<0.01, compared with before operation

\$: p<0.05, §§: p<0.01, compared with 1 week after operation

- As shown in Table 8, ALP activity which is directly related to bone metabolism showed tendency of decrease with aging in entire groups, especially, in Sham group and genistein treated group, the rats of 10 weeks after operation showed significant decrease of ALP activity and no change in calcium concentration compare to the rats prior to operation and one week after operation. And, the level of inorganic phosphate remarkably decreased in the

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

27

rats of 10 weeks after operation compare to the rats prior to operation in control group and genistein treated group.

While the level of blood urea nitrogen which is related to the protein metabolism and muscle volume was maintained at a proper level in entire groups, the level of creatinin increased in entire groups.

The level of total cholesterol which is known to increase in postmenopause women increased in entire groups, although increase in Sham group was relatively low. While 10 the level of HDL-cholesterol decreased with time in entire groups, the level of LDL-cholesterol increased with time, which were found in normal Sham group as well as ovariectomized groups.

Thus, the quercetin of the invention was found to be 15 an effective therapeutic and preventive agent for osteoporosis.

Example 4: The formulation of the quercetin preparation

20 Example 4-1: Syrup

The syrup formulation containing 2% (w/v) quercetin, its derivatives or pharmaceutically acceptable salts thereof was prepared as follows: quercetin hydrochloride, 25 saccharine and sugar were dissolved in 80g of warm water, cooled down, and then mixed with a solution containing glycerin, saccharine, aromatics, ethanol, sorbic acid and distilled water. Water was added to the mixture prepared above to give 100mL of syrup formulation of quercetin, 30 whose components are as follows:

35	quercetin hydrochloride	2g
	saccharine	0.8g
	sugar	25.4g
	glycerin	8.0g
	aromatics	0.04g
	ethanol	4.0g

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

28

sorbic acid 0.4g
distilled water a proper quantity

Example 4-2: Tablet

5 The tablet containing quercetin, its derivatives or pharmaceutically acceptable salts thereof was prepared as follows: 250g of flavonoid derivative of quercetin hydrochloride was mixed with 175.9g of lactose, 10 180g of potato starch, and 32g of colloidal silicate, and then 10% (w/v) gelatin solution was added. After pulverization, the mixture was passed through a 14-mesh sieve, dried, and mixed with 160g of potato starch, 50g of talc, and 5g of magnesium stearate to give tablets, whose 15 components are as follows:

flavonoid derivative of quercetin · hydrochloride · 250g
lactose 175.9g
potato starch 180g
20 colloidal silicate 32g
10% (w/v) gelatin solution a proper quantity
potato starch 160g
talc 50g
magnesium stearate 5g

25 Example 4-3: Injection

One gram of flavonoid derivative of quercetin hydrochloride, 0.6g NaCl, and 0.1g of ascorbic acid were dissolved in distilled water to give a final volume of 100ml, and then the solution was put into a vial, which was sterilized by heating at 100°C for 30 minutes to give the injection. The components of the said injection are as follows:

35 flavonoid derivative of quercetin · hydrochloride 1g
NaCl 0.6g

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

29

ascorbic acid 0.1g
distilled water a proper quantity

As clearly illustrated and demonstrated above, the
5 present invention provides a therapeutic agent for
osteoporosis comprising an active ingredient of quercetin
derivatives which effectively stimulate osteoblast
proliferation and inhibit osteoclast proliferation. The
10 quercetin derivatives of the invention can be practically
applied for the treatment and prevention of osteoporosis,
since they effectively inhibit osteoclast proliferation and
stimulate osteoblast proliferation more than conventional
therapeutic agents for osteoporosis, and increase
15 trabecular bone area highly without changing hormone level
in body and untoward effects on hematopoietic function and
immune system.

20

25

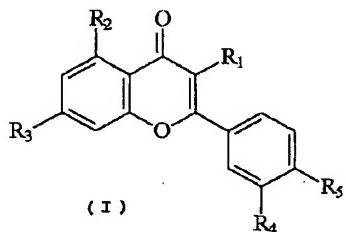
WO 02/17909

PCT/KR01/00368

30

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A therapeutic agent for osteoporosis comprising an active ingredient of quercetin derivatives represented by the following general formula(I) and a pharmaceutically acceptable carrier:



wherein,

- R₁ is gentiotriose, glucopyranose, O-arabinofuranose, O-diglucopyranose, O-galactopyranose, O-galactoside-gallate, C-gentiofuranose, O-glucopyranose, C-glucuronide, O-neohesperidose, O-rhamnopyranose, O-rutinose, O-sophorose, O-xylopyranose, OCH₃, OH, rhamnogentiofuranose, rhamnoglucose or sulfate;
 - R₂ is OH or O-glucopyranose;
 - R₃ is OCH₃, OH, O-glucopyranose, O-glucuronopyranose or glucopyranose;
 - R₄ is OCH₃ or OH; and,
 - R₅ is OCH₃, OH, O-glucopyranose or O-glucose.
2. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1, wherein the quercetin derivatives are compounds represented by general formula(I) whose R₂, R₃, R₄ and R₅ are -OH as followings: quercetin, avicularoside, quiajaverin, hyperoside, isohyperoside, isoquercitrin, multinoside A, multinoside A acstate, quercitrin, rutin, quercetin-3-O-

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

31

- (2"-O- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranoside, quercetin-3-O-(6"-O-galloyl)-glucopyranoside, quercetin-3-O-(6'"-O-p-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl-(1-2)- α -L-rhamnopyranoside), quercetin-3-O-D-glucopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranoside, quercetin-3-O-[2"-O-6'"-O-p-(7""-O- β -D-glucopyranosyl)coumaroyl- β -D-glucopyranosyl]- α -L-rhamnopyranoside, quercetin-3-O-[6'"-p-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl- β -(1-4)-rhamnopyranoside], quercetin-3-O-(α -L-rhamnopyranosyl(1-2)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranoside), quercetin-3-O-[α -rhamnopyranosyl(1-4)- α -L-rhamnopyranosyl(1-6) β -D-galactopyranoside], quercetin-3-
- 10 O- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-galactopyranoside, quercetin-3-O-(α -rhamnopyranosyl-(1-2)]-[β -glucopyranosyl-(1-6)]- β -D-galactopyranoside, quercetin-3-O-(α -rhamnopyranosyl-(1-4)- α -rhamnopyranosyl-(1-6)- β -galactopyranoside], quercetin-3-
- 15 O- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-galactopyranoside, quercetin-3-O- β -D-diglucopyranoside, quercetin-3-O- β -D-galactoside-2"-gallate, quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside-(1-6)- β -D-galactopyranoside, quercetin-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1-3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-
- 20 galactopyranoside, quercetin-3-O- β -D-glucuronide, quercetin-3-O- β -D-xylopyranoside, quercetin-3-O-diglucopyranoside, quercetin-3-O-gentilobioside, quercetin-3-O-glucopyranosylgalactopyranoside, quercetin-3-neohesperidoside, quercetin-3-gentiotrioside, quercetin-3-
- 25 methyl ether, quercetin-3-rhamnogentibioside, quercetin-3-rhamnoglucoside, or quercetin-3-sulfate.

3. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1, wherein the quercetin derivatives are compounds represented by general formula(I) whose R₁ is -OH and three functional groups out of R₂, R₃, R₄ and R₅ are -OH as follows: isorhamnetin, quercimeritrin, rhamnetin, quercetin-5-O- β -D-glucopyranoside, quercetin-7-O- β -D-glucuronopyranoside or spireaoside.

35

4. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1,

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

32

wherein the quercetin derivatives are compounds represented by general formula(I) whose three functional groups out of R₁, R₂, R₃, R₄ and R₅ are -OH as followings: rhamnazin, quercetin-3',4'-di-methyl ether, quercetin-3,3'-dimethyl ether, quercetin-3,7-dimethyl ether, quercetin-3-O-[2"-O-(6"-O-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranosyl]-α-L-rhamnopyranosyl-7-O-β-D-glucopyranoside, quercetin-3-O-[2"-O-6' "-O-p-(7"-O-β-D-glucopyranosyl)coumaroyl-β-D-glucopyranosyl]-α-L-rhamnopyranoside-7-O-β-D-glucopyranoside, quercetin-3-O-rutinoside-7-O-β-D-glucopyranoside, quercetin-3-O-α-L-arabinopyranosyl-7-O-β-D-glucopyranoside, quercetin-7-O-β-D-glucopyranoside-3-O-sophoroside, quercetin-3-O-galactopyranosyl-7-O-diglucopyranoside, quercetin-3-O-glucopyranosyl-7-O-diglucopyranoside, quercetin-3,7-diglucopyranoside, quercetin-3-gentichiosyl-7-glucopyranoside or quercetin-3,4'-di-O-β-D-glucopyranoside.

5. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1, wherein the quercetin derivative is quercetin-3,4',7-trimethyl ether or quercetin-3,3',4',7-tetramethyl ether.

6. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1, wherein the pharmaceutically acceptable carrier is selected from the group consisting of polyvinylpyrrolidone and hydroxypropylcellulose.

7. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1, wherein the pharmaceutically acceptable carrier is a disintegrating agent selected from the group consisting of calcium carboxymethylcellulose and sodium glycolate starch.

8. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1, wherein the pharmaceutically acceptable carrier is a diluting agent selected from the group consisting of corn starch, lactose, soybean oil, crystalline cellulose and mannitol.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

33

9. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1,
wherein the pharmaceutically acceptable carrier is a
lubricating agent selected from the group consisting of
5 magnesium stearate and talc.

10. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1,
wherein the pharmaceutically acceptable carrier is a
sweetener selected from the group consisting of sucrose,
10 fructose, sorbitol and aspartame.

11. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1,
wherein the pharmaceutically acceptable carrier is a
stabilizing agent selected from the group consisting of
15 sodium carboxymethylcellulose, α - or β -cyclodextrin,
vitamin C, citric acid and white wax.

12. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1,
wherein the pharmaceutically acceptable carrier is a
20 preservative selected from the group consisting of
paraoxymethylbenzoate, paraoxypropylbenzoate and sodium
benzoate.

13. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1,
25 wherein the pharmaceutically acceptable carrier is an
aromatic selected from the group consisting of
ethylvanillin, masking flavor, flavonomenthol and herb
flavor.

30 14. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1,
wherein the therapeutic agent is a pharmaceutical
formulation for oral or parenteral administration selected
from the group consisting of tablets, capsules, soft
capsules, liquids, ointments, pills, powders, suspensions,
35 emulsions, syrups, suppositories and injections.

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

34

15. The therapeutic agent for osteoporosis of claim 1
which further comprises calcium or vitamin D₃.

5

10

15

20

25

30

35

【國際調査報告】

WO 02/17909

PCT/KR01/00368

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC7 A61K 31/353 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC7; C07D; A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CASLINK; BSPACE-NET		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 63-156730 A (KISSEI CO.) 29. 06. 88, see the whole document, (Family; none)	1-15
A	WO 95/03293 A (CHUNION LTD.) 02. 02. 95, see the whole document	1-15
A	JP 60-048924 A (TAKEDA LTD.) 16. 05. 85, see the whole document	1-15
A	US 6,040,330 A (SHERRY D.) 21. 03. 00, see the whole document, (Family; none)	1-15
A	Morelli, G. et al., 'Histone synthesis in human colon cancer epithelial cells', In: J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1999, 71(5-6), 223-230.	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<small> * Special category of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent not published on or after the international filing date "C" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other specific reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </small>		
Date of the actual completion of the international search 27 JUNE 2001 (27.06.2001)	Date of mailing of the international search report 29 JUNE 2001 (29.06.2001)	
Name and mailing address of the ISA/KR Korea Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, Daedeok-dong, Deajeon Metropolitan City 302-701, Republic of Korea Fax/Email No. +82-42-472-7140	Authorized Officer  Lee, Yu Hyung Telephone No. +82-42-481-5603	

Form PCT/IISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/KR01/0368	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 95/03293 A	02. 02. 95	AU 7236794 A CA 2167597 A CN 1129445 A DE 710234 A HU 68558 A	20. 02. 95 02. 02. 95 21. 08. 96 08. 05. 96 28. 06. 95
JP 60-048924 A	16. 03. 85	DE 3430799 A EP 135172 A IT 1179067 A	14. 03. 85 27. 03. 85 16. 09. 87

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 河 恵景

大韓民国 ソウル特別市 道峰区 道峰1洞 ソウルガーデンアパート 1-408

(72)発明者 宋 啓用

大韓民国 ソウル特別市 瑞草区 方背洞 922-6

F ターム(参考) 4C057 BB02 BB03 DDO1 KK08

4C062 EE63

4C086 AA01 AA02 BA08 EA11 MA01 MA04 MA16 MA23 MA28 MA31
MA35 MA37 MA43 MA52 MA66 NA14 ZA97